

Otimização de processos hidrotérmicos para o fracionamento seletivo da palha de cana-de-açúcar

Pedro Barros Louro Martins

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientador: Professora Doutora Helena Margarida Nunes Pereira

Coorientador: Doutora Florbela de Oliveira Carvalheiro Esteves Amaro

Júri:

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar com agregação,
Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutora Florbela de Oliveira Carvalheiro Esteves Amaro, Investigadora Auxiliar,
Laboratório Nacional de Energia e Geologia, coorientadora.

Doutora Isabel Maria Silva Sanches de Miranda, Técnica Superior, Instituto
Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Lisboa, 2015

Dedico este trabalho aos meus pais, irmão e avós.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos os que tornaram possível este trabalho.

Ao Doutor Gírio, coordenador da Unidade de Bioenergia do LNEG, na qual realizei este trabalho, pela oportunidade concedida.

À Doutora Florbela Carvalheiro, pela orientação científica, toda a ajuda, dedicação, compreensão e inesgotável paciência.

À Professora Doutora Helena Pereira pela orientação científica, simpatia e disponibilidade.

Ao investigador Luís Duarte pelos ensinamentos, paciência e profissionalismo.

À Céu pelo auxílio laboratorial.

À Ivone e à Patrícia por me terem feito sentir em casa desde o primeiro dia e por todos os ensinamentos, ajuda e disponibilidade.

À Natália, à Ana, ao Pedro Branco e à Marlene e ao João por toda a ajuda e por nunca deixarem existir um dia aborrecido.

À Jaqueline e a todos os meus amigos, pela compreensão e sobretudo pela paciência.

Por fim, aos meus pais e ao meu irmão por todo o amor, apoio e auxílio ao longo dos anos. Obrigada por me aturarem.

Resumo

A produção de açúcar (e etanol) representam uma das principais agroindústrias a nível mundial. A palha de cana-de-açúcar é, a par com o bagaço, um dos principais resíduos resultantes destas indústrias. A palha, especificamente, tem vindo a ter uma relevância crescente, fruto das alterações processuais da colheita em curso, com a substituição da colheita manual onde se procedia à queima da palha, pela colheita mecanizada. É assim necessário encontrar processos que valorizem este resíduo, até há pouco inexistente.

Neste trabalho, pretende-se estudar e otimizar um processo de aproveitamento da palha de cana-de-açúcar, baseado na utilização do processo de auto-hidrólise para o fracionamento deste material. O processo foi otimizado, tendo sido possível hidrolisar seletivamente a hemicelulose, obtendo-se hidrolisados ricos em xilo-oligossacáridos de elevado potencial comercial para a indústria alimentar. Na condição considerada ótima (210°C (Log $R_0=3,85$)), foi possível obter uma concentração de xilo-oligossacáridos de 11,12 g/L, a que corresponde um rendimento de 47,49%, praticamente sem formação de compostos inibidores. Foi ainda possível obter sólidos de elevado teor em celulose e lenhina, cuja digestibilidade enzimática foi aumentada, obtendo uma percentagem de sacarificação da ordem dos 80%, relevante para a sua utilização industrial subsequente no âmbito das biorrefinarias.

Palavras-chave: auto-hidrólise, biomassa, biorrefinaria, hemicelulose, hidrólise enzimática, xilo-oligossacáridos

Abstract

Sugar (and ethanol) production represent is one of the most important agro industries worldwide. Sugarcane straw is, along with sugarcane bagasse, one of the main waste products of these industries. Mainly, the straw has been more relevant with the passing years due to the changes in the harvest policy, with the replacement of manual harvest, in which the straw was burned, by mechanical harvest. It is therefore necessary to find processes that can contribute to the upgrade of this residue, which did not exist so far.

In this work, we study and optimize one process for the upgrading of sugarcane straw, based on the use of autohydrolysis for biomass fractionation. This process was optimized, enabling a selective hydrolysis of hemicellulose, together with the production of xylo-oligosaccharides rich hydrolysate with high commercial potential to the food industry. In the optimal condition (210°C (Log R_0 =3.85)), it was possible to obtain a xylo-oligosaccharide concentration of 11.12 g/L, corresponding to a 47.49% yield, with low production of inhibitor compounds. Furthermore, it was possible to obtain solid residues with high cellulose and lignin content, whose enzymatic digestibility was increased, reaching a percentage of saccharification of 80%, relevant to their subsequent industrial use within biorefineries

Keywords: Autohydrolysis, biomass, biorefinery, hemicellulose, enzymatic hydrolysis, Xylo-oligosaccharides.

Extended Abstract

Sugarcane is widely cultivated mainly in South America and Asia, for the commercial production of sugar. Traditionally, sugarcane harvest was done manually, applying an initial burn, removing the sugarcane straw and making the harvesting process easier. Currently, growing environmental concerns and policies are leading to a ban on the manual harvesting method, replacing it with mechanized harvest. With the mechanized method, sugarcane straw is not removed before the harvest, creating a residue that is largely left in the field in huge amounts, making sugarcane straw one of the most significant waste by-products from the sugar industry, with increasing global importance. Although it is being produced in increasing amounts.

With this increasing problem, upgrade alternatives have to be developed to face this issue as there are none efficient upgrading techniques for its valorisation.

In this work we studied and optimized the autohydrolysis of sugarcane straw as a biomass pre-treatment/fractionation step. The high polysaccharide content found in this material, and quantified in this study (above 65%) makes sugarcane straw a promising candidate for the biotechnological valorisation within the biorefinery concept. The hemicellulose content found in this material (28.5%) is particularly relevant for this upgrade, and its removal was studied in this work with the main objective of obtaining xylo-oligosaccharides that can be easily valorised in a wide range of industrial applications, most noteworthy, food/feed and pharmaceutical applications.

For this, the autohydrolysis process was carried out in temperatures ranging from 170°C to 230°C under non-isothermal conditions to study the kinetic behaviour of the reaction and the recovery of xylo-oligosaccharides. Special attention was also given to glucan (cellulose) hydrolysis.

Under the optimal conditions found it was possible to hydrolyse 47.49% of hemicellulose to obtain a hydrolysate containing 11.2 g/L of xylo-oligosaccharides, with limited effects on cellulose hydrolysis/removal and on the lignin fraction of the material. It was also possible to obtain this high yield of xylo-oligosaccharides together with low formation of degradation compounds, such as furfural and hydroxymethylfurfural. Furthermore, it was possible to obtain a solid residue rich in cellulose and lignin that could also be valorised. A FTIR analysis was done to further study the effects of the autohydrolysis pre-treatment, indicating a clear removal of hemicellulose from the solid phase, with little removal of cellulose and lignin of the material.

Enzymatic hydrolysis was studied in order to assess the saccharification yield of the pre-treated solids, producing a liquid solution rich in glucose that can be used in subsequent bioethanol production. This process led to very promising results (80% saccharification), similar to those found for steam-explosion pre-treated solids and diluted acid techniques, with the advantage that autohydrolysis also produces higher amounts of oligosaccharides.

With this study we were able to validate the autohydrolysis pre-treatment as a viable and promising fractionation method for sugarcane straw, in the biorefinery framework.

Lista de abreviaturas

Ara	Arabinose
D _p	Diâmetro médio das partículas
DAD	Detetor de fotodíodos (do inglês “ <i>Diode Array Detector</i> ”)
DNS	Ácido 2-hidroxi-3,5-dinitrobenzoico ou ácido 3,5-dinitrosalicílico (do inglês “ <i>3,5-Dinitrosalicylic acid</i> ”)
F	Fator de correção
FPase	Atividade celulolítica total sobre papel de filtro
FTIR	Espetroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
Furf	Furfural
GAE	Equivalentes de ácido gálico (do inglês “ <i>Gallic Acid Equivalents</i> ”)
Glc	Glucose
GlcOS	Gluco-oligossacáridos
H	Humidade
HMF	5-hidroximetilfurfural
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Pressão (do inglês <i>High Pressure Liquid Chromatography</i>)
IR	Índice de refração
LK	Lenhina <i>Klason</i>
LNEG	Laboratório Nacional de Energia e Geologia
Log R_0	Fator de severidade
NREL	Laboratório Nacional de Energias Renováveis (do inglês “ <i>National Renewable Energy Laboratory</i> ”)
OS	Oligossacáridos
PNP	p-nitrofenol
PNPG	p-nitrofenil-β-D-glucopiranósido
R ₀	Ordenada da reação
RLS	Razão líquido-sólido
TFA	Ácido trifluoroacético
UV	Ultravioleta
VIS	Visível
XOS	Xilo-oligossacáridos
Xyl	Xilose

Índice

Resumo.....	i
Abstract	ii
Extended Abstract	iii
Lista de abreviaturas.....	v
Índice de Tabelas	ix
Índice de figuras.....	x
1. Introdução.....	1
1.1. Conceito de biorrefinaria	1
1.2. A biomassa	3
1.3. Materiais lenhocelulósicos e os seus componentes	3
1.3.1. Celulose.....	5
1.3.2. Lenhina	5
1.3.3. Hemiceluloses	6
1.4. A cana-de-açúcar.....	9
1.4.1. Panorama da plantação de cana-de-açúcar e dos seus maiores produtores.....	10
1.4.2. Palha de cana-de-açúcar.....	15
1.5. Métodos de fracionamento de materiais lenhocelulósicos	16
1.5.1. Métodos de fracionamento	18
1.5.2. Métodos ácidos	19
1.5.2.1. Hidrólise com ácidos concentrados	19
1.5.2.2. Hidrólise com ácidos diluídos	20
1.5.3. Métodos hidrotérmicos	22
1.5.3.1. Auto-hidrólise.....	22
1.5.3.2. Explosão com vapor	24
1.5.4. Métodos alcalinos	24
1.5.5. Hidrólise enzimática.....	25
1.5.6 Processos <i>Organosolv</i>	26
1.5.7 Fator de severidade	27
1.6 Objetivos	28
2. Materiais e Métodos	29
2.1 Matéria-prima	29
2.2. Caracterização granulométrica da matéria-prima	29

2.3. Fracionamento seletivo da palha de cana-de-açúcar	30
2.3.1. Auto-hidrólise	30
2.3.2. Hidrólise enzimática	31
2.4. Métodos analíticos	32
2.4.1. Determinação da humidade	32
2.4.2. Determinação da cinza	32
2.4.3. Determinação do peso seco dos hidrolisados	32
2.4.4. Determinação de compostos extratáveis	33
2.4.5. Determinação do teor proteico	33
2.4.6. Quantificação de monossacáridos, ácidos alifáticos e compostos furânicos por HPLC	33
2.4.7. Determinação de polissacáridos, grupos acetilo e lenhina <i>Klason</i>	34
2.4.8. Determinação do teor de oligossacáridos	35
2.4.9 Cálculos da caracterização química da matéria-prima e resíduos sólidos	35
2.4.10 Cálculo de rendimentos	37
2.4.11. Quantificação da atividade das enzimas comerciais	40
2.4.12. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	41
3. Resultados e discussão	43
3.1. Caracterização da matéria-prima	43
3.1.1. - Caracterização granulométrica	43
3.1.2. Caracterização química	44
3.2. Auto-hidrólise	46
3.2.1. Perfis de auto-hidrólise	46
3.2.2. Caracterização dos licores	51
3.2.3. Caracterização química do sólido	54
3.3. Análise FTIR	55
3.4. Hidrólise enzimática	58
3.5. Perspetiva de aplicação	59
4. Conclusões e perspetivas futuras	64
Bibliografia	65
Anexos	76
Anexo I. Métodos analíticos	77
Anexo II. Determinação das atividades enzimáticas	80

Índice de Tabelas

Tabela 1- Composição química de alguns materiais lenhocelulósicos. Adaptado de (Moniz, 2014).	4
Tabela 2- Principais polímeros constituintes das hemiceluloses presentes em madeiras folhosas, resinosas, gramíneas e cereais. Adaptado de (Gírio et al., 2010).	8
Tabela 3 – Comparação de alguns processos utilizados para o fracionamento de materiais lenhocelulósicos. Adaptado de Carvalheiro et al. (2013).	17
Tabela 4 – Exemplos de condições operacionais utilizadas em tratamento de auto-hidrólise de diversos materiais lenhocelulósicos.	23
Tabela 5 - Lista de peneiros utilizados para a caracterização granulométrica.	29
Tabela 6 - Características da coluna cromatográfica HPX-87H e respetivas condições operacionais de análise.	34
Tabela 7 – Condições de determinação das atividade enzimáticas de FPase, celobiase e endoglucanase para preparação dos ensaios de sacarificação.	41
Tabela 8 – Composição química da palha de cana-de-açúcar.	44
Tabela 9 – Valores de pH e composição química dos licores obtidos após auto-hidrólise de palha de cana-de-açúcar.	52
Tabela 10 – Aproveitamento monetário teórico da palha de cana-de-açúcar através dos tratamentos a 210°C e 230°C testados neste estudo.	62
Tabela 11 - Reagentes utilizados na determinação da proteína total.	79
Tabela 12 - Preparação da curva de calibração do método do DNS	80

Índice de figuras

Figura 1- Ilustração do conceito de biorefinaria. Adaptado de:(SIADEB, 2013).	2
Figura 2- Estrutura da biomassa lenhocelulósica. Adaptado de (Santos et al., 2012).	3
Figura 3- Álcoois precursores da lenhina: álcool cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico. Adaptado de (Biermann, 1996).	6
Figura 4- Esquema ilustrativo da constituição da cana-de-açúcar. Fonte: (BNDES & CGEE, 2008)	9
Figura 5 - Panorama global da produção mundial de cana-de-açúcar no ano de 2013. Fonte:(FAOSTAT, 2013).	11
Figura 6 - Principais produtores mundiais de cana-de-açúcar e seus valores de produção em 2013. Fonte: (FAOSTAT, 2013)	11
Figura 7- Colheita manual de cana-de-açúcar. Fonte: (“Crayonstock.com,” 2014).	12
Figura 8 - Colheita mecanizada de cana-de-açúcar. Fonte: (“BC Rural,” 2013).	13
Figura 9 - Principais produtores de cana-de-açúcar Sul-americanos (exceto o Brasil), e seus valores de produção em 2013. Fonte: (FAOSTAT, 2013).	14
Figura 10 - Alterações estruturais no material lenhocelulósico causadas por pré-tratamento. Adaptado de (Hsu et al., 1980)	16
Figura 11 – Esquema dos principais produtos obtidos a partir da dos materiais lenhocelulósicos, durante os processos de hidrólise(Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000).	21
Figura 12 – Caracterização granulométrica da palha de cana-de-açúcar utilizada.	43
Figura 13 - Perfis de temperatura (●) e pressão (▲) obtidos para a auto-hidrólise da palha de cana-de-açúcar.	47
Figura 14 - Efeitos da auto-hidrólise no rendimento em (arabino)xilanas (●), na fase sólida, xilo-oligossacáridos (◆), pentoses monoméricas (▲) e furfural (X) na fase líquida	48
Figura 15 - Efeitos da auto-hidrólise no rendimento em pentoses totais.	49
Figura 16 – Efeitos da auto-hidrólise no rendimento em glucanas (■), gluco-oligossacáridos (▲), glucose (◆) e HMF (X).	50
Figura 17 - Efeitos da auto-hidrólise no rendimento em lenhina Klason após auto-hidrólise	51
Figura 18 - Variação de pH nos licores resultantes da auto-hidrólise em função da concentração de ácidos alifáticos presentes.	53
Figura 19 - Composição dos sólidos obtidos após auto-hidrólise, em função do fator de severidade. Nesta figura estão representados os teores obtidos de glucanas (■), Xilanas (■), arabinanas (■), grupos acetilo (■), lenhina Klason (■) e rendimento em sólido (—).	55

Figura 20 - Espectros de FTIR obtidos para amostra de matéria-prima (-) e sólidos pré-tratados a 210 (-) e 230 C (-).....	56
Figura 21 - Percentagens de sacarificação obtidas após hidrólise enzimática da matéria-prima (MP) e resíduos sólidos dos tratamentos. Glucose (■) e xilose (■).	58
Figura 22 - Balanço de aproveitamento da palha de cana-de-açúcar utilizando auto-hidrólise a 210°C e 230°C testada neste estudo.	60
Figura 23 - Rendimento teórico da produção de etanol por tonelada de palha de cana-de-açúcar (adaptado de : (Santos et al., 2012).....	61

1. Introdução

1.1. Conceito de biorrefinaria

O conceito de biorrefinaria nasce com a preocupação moderna com o reaproveitamento e desenvolvimento sustentável, crescente nos últimos anos. Esta preocupação torna-se cada vez mais acentuada e relevante com o passar dos anos, devido à conjuntura económica, política e social. A possível diminuição dos combustíveis fósseis disponíveis, a par com as flutuações de preços de mercado, têm contribuído para uma aposta cada vez maior em fontes de energia alternativas renováveis. São cada vez mais procuradas alternativas renováveis, menos poluentes e economicamente viáveis. No que diz respeito à obtenção de energia, existem alternativas viáveis e com elevado potencial, tais como as instalações de energia solar, eólica, hídrica ou energia proveniente de biomassa. No caso da biomassa, em particular, para além da valorização energética, existem outras alternativas/produtos que podem ser obtidos.

É neste contexto que surge o conceito de biorefinaria, que pode ser definida de forma análoga a uma refinaria de petróleo, diferindo fundamentalmente na matéria-prima utilizada. O conceito de biorefinaria (Figura 1) refere-se a uma instalação industrial que procura a utilização integral da biomassa, de forma sustentável, para a produção de biocombustíveis, energia, materiais e produtos químicos, preferencialmente de valor acrescentado (Biopol, 2008; SIADEB, 2013). Tendo como objetivo a produção de uma larga gama de compostos, as biorefinarias podem tirar o máximo partido dos diversos componentes da biomassa para a produção de uma grande diversidade de compostos e energia, valorizando ao máximo as suas matérias-primas. Deste modo, o modelo de biorefinaria é um dos mais promissores modelos de futuro para um desenvolvimento sustentável a nível global (Escária, 2008).

Na última década o impacto das biorefinarias no contexto energético e na produção de químicos e de materiais intensificou-se cada vez mais ao nível mundial. Embora o conceito de biorefinaria seja similar ao das refinarias petroquímicas, a natureza química e física da biomassa requer uma especial atenção aos processos de separação e transformação, sejam eles físicos ou químicos ou biológicos (Ragauskas *et al.*, 2003).

Existem várias classificações para as biorefinarias: de acordo com o processo tecnológico, matéria-prima utilizada ou tecnologia dos processos. Neste tipo de instalações pode estar envolvida uma panóplia diversificada de processos tecnológicos, tais como processos de separação, de conversão, termoquímica, química ou bioquímica. O último

objetivo é sempre tirar o maior partido da biomassa utilizada. Uma das classificações mais utilizadas para as biorefinarias baseia-se no tipo de processos tecnológicos utilizados, definindo-se diferentes plataformas, i.e., bioquímica, termoquímica, biodiesel e biogás (Kamm, 2006; Kamm, 2007). De entre estas últimas, as mais importantes são as plataformas termoquímica e bioquímica. A plataforma termoquímica envolve a decomposição de biomassa utilizando energia térmica e catalisadores de forma a produzir, por exemplo, gás de síntese, óleos de pirólise, combustíveis líquidos e gasosos, bem como, produtos de valor acrescentado.

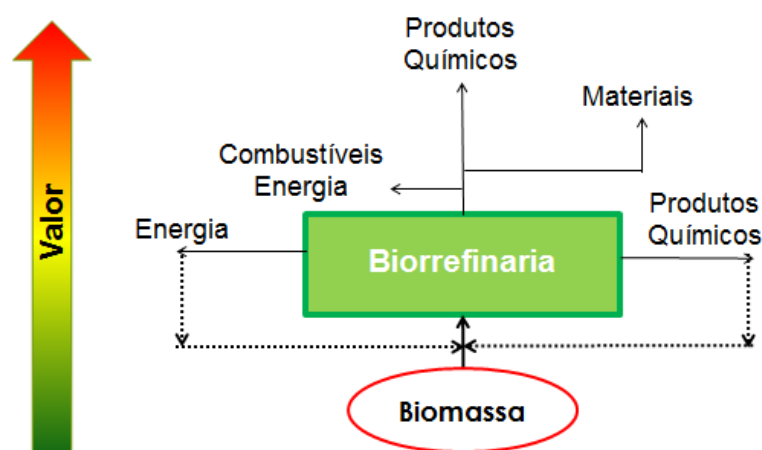


Figura 1- Ilustração do conceito de biorefinaria. Adaptado de:(SIADEB, 2013).

A plataforma bioquímica (e a utilizada neste trabalho) caracteriza-se por utilizar processos de pré-tratamento da biomassa físicos, físico-químicos, químicos ou biológicos, com o objetivo de converter a biomassa utilizada em açúcares simples e posterior fermentação microbiana, por exemplo, com vista à produção de biocombustíveis líquidos (como o bioetanol) e produtos químicos preferencialmente de valor acrescentado. O uso destas plataformas está dependente do tipo de instalação pretendida. Um dos grandes desafios é aperfeiçoar os mecanismos e as sinergias entre os vários processos/plataformas, de modo a poder utilizar uma gama alargada de matérias-primas e conseguir tirar a maior rentabilidade possível das mesmas, tendo em conta a sua diversidade estrutural.

1.2. A biomassa

Define-se como biomassa a toda a matéria orgânica renovável disponível na natureza proveniente de fontes variadas tais como: madeiras e outros materiais florestais, culturas agrícolas e silvícolas, detritos animais, subprodutos industriais e resíduos sólidos urbanos. Destes, a biomassa vegetal é a mais interessante para utilização como matéria-prima na produção de energia, combustíveis e outros materiais, devido à sua composição e abundância. É estimado que a produção anual de biomassa vegetal no planeta seja de $1,7 \times 10^{11}$ ton, das quais apenas 3,5% (6×10^9 ton) são utilizadas (Dermibas, 2009).

De entre a restante biomassa desperdiçada, encontram-se resíduos agroflorestais e industriais de natureza lenhocelulósica, constituindo uma crescente problemática ambiental. Entre as várias matérias-primas passíveis de serem utilizadas para a produção de biocombustíveis no âmbito da plataforma bioquímica, por exemplo, a biomassa lenhocelulósica é considerada a mais vantajosa pois não compete com a produção de alimentos no que diz respeito à utilização dos solos, sendo também sustentável a nível ambiental (USI, 2009).

1.3. Materiais lenhocelulósicos e os seus componentes

Os materiais lenhocelulósicos (Tabela 1) são a maior fonte de biomassa inutilizada no planeta, sendo uma grande parte composta por subprodutos de atividades agrícolas e florestais (Niga, 2010). Entende-se por materiais lenhocelulósicos a matéria orgânica de origem vegetal constituída por polissacáridos (celulose e hemicelulose) e lenhina (Fengel & Wegener, 1983). Este material é constituído principalmente por três tipos de compostos macromoleculares: celulose (30-

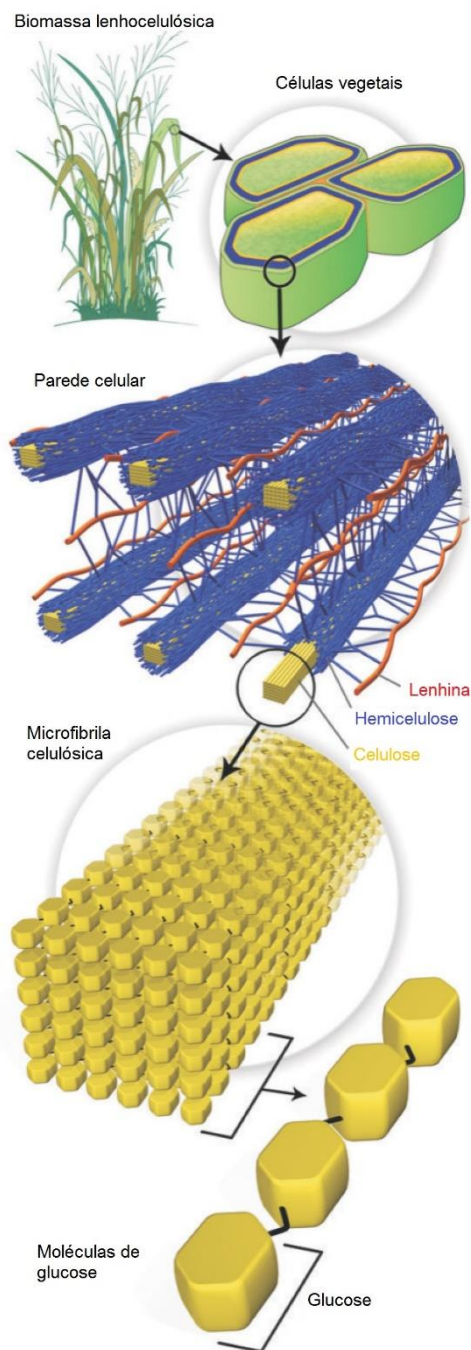


Figura 2- Estrutura da biomassa lenhocelulósica. Adaptado de (Santos et al., 2012).

50%), hemiceluloses (15-35%) e lenhina (10-20%) (Limayem & Ricke, 2012). Este tipo de matéria é um importantíssimo recurso renovável, constituindo uma matéria-prima de baixo custo para obtenção de biocombustíveis, materiais e produtos químicos de valor acrescentado (Boussarsar *et al.*, 2009).

Tabela 1- Composição química de alguns materiais lenhocelulósicos. Adaptado de (Moniz, 2014).

Material	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lenhina (%)	Autores
Materiais agrícolas e agroindustriais				
Bagaço de azeitona	36,4	26,8	26	(Brás <i>et al.</i> , 2014)
Bagaço de cana-de-açúcar	35-42,8	26,2-35,8	16,1-25,2	(Imman <i>et al.</i> , 2013; Geddes <i>et al.</i> , 2011)
Cana de bambu	38,8	24,9	23,9	(González <i>et al.</i> , 2011)
Carolo de milho	31,7-39,4	31,9-34,7	15,9-22,3	(Cheng <i>et al.</i> , 2010; Oliveira <i>et al.</i> , 2010)
Casca de arroz	36,7-37,7	16,7-17,3	21,3-22,1	(Mancilha & Karim, 2003; Vila <i>et al.</i> , 2002)
Dreche cervejeira	9-18	19-31	16-25	(Prentice & D'Appolonia, 1977; Beldman <i>et al.</i> , 1987)
Palha de arroz	36,4	25,23	16,51	(Yu <i>et al.</i> , 2010)
Palha de cevada	30,8	25,3	16,7	(Nabarlatz <i>et al.</i> , 2007)
Palha de milho	42,1	29,2	17,5	(Moniz <i>et al.</i> , 2013)
Palha de trigo	31,5	25,2	15,9	(Nabarlatz <i>et al.</i> , 2007)
Palha de sorgo	43,3	23,8	21,7	(Kim & Day, 2011)
Resíduos de milho ("corn stover")	35,1-40,9	16,8-27,7	15,1-22,3	(Torget <i>et al.</i> , 1991; Lee, 1997)
Madeiras resinosas				
Abeto	43-51,1	15,2-26	27,3-29	(Fengel & Wegener, 1983; Olsson & Hahn-Hägerdal, 1996)
Pinheiro	42,9-52,2	13,5-26	26,3-30,2	(Fengel & Wegener, 1983; Rivas <i>et al.</i> , 2012)
Madeiras folhosas				
Carvalho	38,9-44	18,7-23,8	21,5-24,7	(Kim <i>et al.</i> , 2000)
Eucalipto	38-54	15-30	23,1-37	(Miranda & Pereira, 2002; Carrasco <i>et al.</i> , 1986)

1.3.1. Celulose

A celulose é um homopolímero com funções estruturais, sendo um dos compostos orgânicos mais abundantes na biosfera. Caracteriza-se por ser um polímero não ramificado de moléculas de glucose ligadas entre si através de ligações glicosídicas β -1,4. Este tipo de ligações permite a formação de cadeias longas de celulose. Neste polímero, as moléculas de glucose ligam-se com as moléculas adjacentes por uma rotação de 180° , e o átomo de oxigénio do anel de cada uma estabelece uma ponte de hidrogénio com a ligação 3-OH da molécula seguinte. Por sua vez, as cadeias lineares de celulose organizam-se paralelamente formando fibrilas elementares de celulose, possuindo elevada força de tensão (Stryer, 1998). A agregação de fibrilas elementares dá origem a microfibrilas, constituídas por regiões cristalinas altamente ordenadas e secções amorfas (Kirk & Farrell, 1987). A sua enorme abundância na biosfera confere-lhe um enorme potencial para se tornar numa das alternativas à utilização de recursos fósseis (Kim *et al.*, 2000), para a produção sustentável de químicos e combustíveis (Onda *et al.*, 2009), nomeadamente etanol.

1.3.2. Lenhina

A lenhina é um dos polímeros naturais mais abundantes no planeta, constituindo entre 15 e 25% da biomassa vegetal. Caracteriza-se por ser um heteropolímero aromático complexo e de natureza amorfa, insolúvel em água e de difícil degradação. É um polímero de massa molecular elevada e natureza polifenólica, constituído por unidades de fenilpropano ligadas através de ligações éter e carbono-carbono com diversos padrões de ligação (Fengel & Wegener, 1983). Através destas ligações forma-se uma estrutura tridimensional complexa e de difícil degradação biológica. Este polímero atua como uma barreira física de proteção dos hidratos de carbono, impedindo a degradação da celulose (conferindo às suas fibras um carácter hidrofóbico) e da hemicelulose das plantas (Huang *et al.*, 2010).

A lenhina é constituída por moléculas de álcool cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico, variando na sua quantidade consoante a espécie vegetal de onde é proveniente (Fengel & Wegener, 1983).

Este composto assume uma importância fundamental do ponto de vista estrutural no Reino vegetal, depositando-se maioritariamente nas regiões intercelulares vegetais, conferindo às plantas um suporte físico importantíssimo (Fengel & Wegener, 1983). Apesar da sua deposição no espaço intercelular, parte da lenhina encontra-se também associada às hemiceluloses na parede celular (Sjöström, 1981).

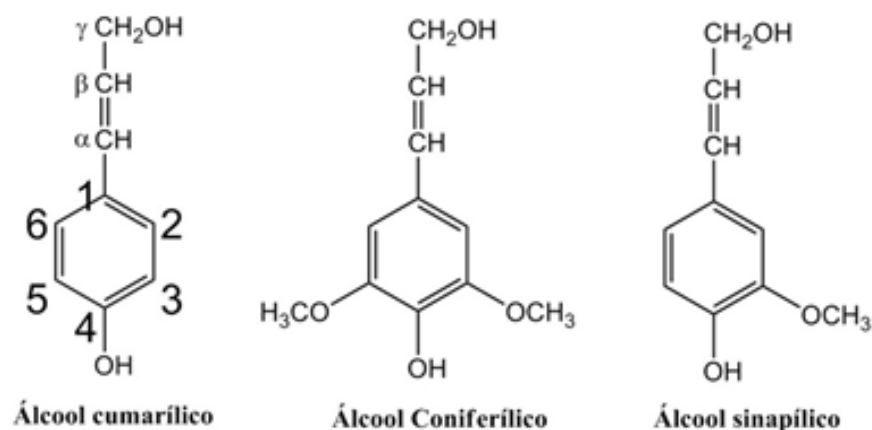


Figura 3- Álcóois precursores da lenhina: álcool cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico. Adaptado de (Biermann, 1996).

Consoante a sua proveniência, a sua constituição pode diferir de acordo com a sua proveniência de madeiras folhosas ou resinosas. As madeiras folhosas apresentam, em média, maior abundância de polissacáridos e compostos extrativos. Por outro lado, as madeiras resinosas possuem um maior teor de lenhina.

Devido à sua natureza química, este tipo de composto é pouco afetado por ácidos, bases ou enzimas sendo assim um dos polímeros naturais mais resistentes. No entanto, este polímero é mais sensível do que outros polissacáridos a reações de oxidação ou a ação de solventes orgânicos (Weng *et al.*, 2008).

A lenhina tem propriedades notáveis (Lora *et al.*, 2002), possibilitando a sua utilização em diversas aplicações. No âmbito das biorefinarias, têm sido desenvolvidos diferentes processos de onde se destacam os processos oxidativos para a conversão da lenhina em compostos fenólicos de alto valor acrescentado (Pinto *et al.*, 2010).

1.3.3. Hemiceluloses

As hemiceluloses são o segundo polímero mais abundante na biomassa lenhocelulósica. Caracterizam-se por serem heteropolissacáridos lineares ou ramificados, constituídos maioritariamente por pentoses (D-xilose e L-arabinose) e hexoses (D-glucose, D-galactose e D-manose). Apresenta também quantidades reduzidas de L-fucose, L-ramnose ácidos urónicos (ácido D-glucorónico, ácido D-4-O-metilglucorónico, ácido D-galacturónico) e

grupos acetilo. É um componente estrutural predominantemente presente na parede celular secundária das células vegetais, sendo bastante suscetível de degradação devido ao seu carácter amorfo e de baixo grau de polimerização (Silva, 2013).

Este composto representa aproximadamente 15-35% da biomassa vegetal, dependendo a sua composição da origem biológica (Gírio *et al.*, 2010). No que diz respeito à sua natureza e abundância, existem diferenças entre as hemiceluloses provenientes de madeiras folhosas e resinosas. As folhosas têm uma maior percentagem de hemiceluloses (entre 24-40%) do que as resinosas (entre 25-35%) (Sun & Cheng, 2002). Nas madeiras folhosas, as hemiceluloses predominantes são as glucuroxilanas (O-acetil-4-O-metilglucurono- β -D-xilanas), xiloglucanas e as glucomananas (em menor quantidade). No caso das madeiras resinosas são mais abundantes as galactoglucomananas (O-acetil-galactoglucomananas), contendo também algumas xilanas (Fengel, D. e Wegener, 1983). O grau de polimerização das hemiceluloses é bastante inferior ao da celulose variando entre 100 e 200 para as madeiras folhosas e 70 a 130 para as madeiras resinosas (Fengel & Wegener, 1983).

As hemiceluloses podem dividir-se em diversos grupos, sendo os mais importantes os xiloglucanas, xilanas, mananas e glucomananas, distinguindo-se maioritariamente pela constituição da sua estrutura de base. Deste modo, no esqueleto das xiloglucanas predominam moléculas de glucose e xilose, nas xilanas abunda xilose, nas mananas denota-se a presença maioritária de manose, e nas glucomananas predomina glucose e xilose. No geral, as hemiceluloses caracterizam-se pelas ligações glicosídicas β -1,4 entre os seus açúcares, formando uma cadeia linear, podendo apresentar ramificações. As ramificações das cadeias são de especial relevância pois confere diferenciação funcional e taxonómica entre as várias formas de hemiceluloses. Entre outros parâmetros, o grau de ramificação das cadeias afeta a solubilidade das hemiceluloses (principalmente no caso das xiloglucanas) (Scheller & Ulvskov, 2010).

Na Tabela 2 estão representadas resumidamente as hemiceluloses mais comuns nos tipos de materiais lenhocelulósicos mais representativos.

As madeiras resinosas apresentam um teor superior em unidades de manose e glucose quando comparados às hemiceluloses das madeiras folhosas ou resíduos agrícolas. Nestes dois últimos grupos de materiais, de um modo geral, cerca de 80% dos açúcares constituintes das hemiceluloses correspondem à xilose, sendo assim frequente associar o teor de hemiceluloses à quantidade de xilanas existente (Moure *et al.*, 2006).

As xilanas mais frequentes são formadas por uma cadeia principal de xilose ligada através de ligações β -1,4, onde as unidades estruturais são substituídas por uma arabinose, ácido glucurónico, acético, ferúlico e *p*-cumárico (Moure *et al.*, 2006). As xilanas e arabinoxilanas têm sido identificadas em diversos cereais; tais como o trigo, cevada ou milho; bem como em outras plantas herbáceas, representando um dos componentes principais da parede celular das suas células.

Tabela 2- Principais polímeros constituintes das hemiceluloses presentes em madeiras folhosas, resinosas, gramíneas e cereais. Adaptado de (Gírio *et al.*, 2010).

Origem do material	Tipo de hemicelulose	% biomassa seca	Cadeia principal	Cadeias laterais	Tipos de ligação
Madeiras folhosas	Xiloglucanas	2-25	D-Glc _p D-Xyl _p	D-Xilose	β -1,4
				D-Galactose	α -1,3
				L-Arabinose	β -1,2
				L-Fucose	α -1,2
				Grupos acetilo	α -1,2
	Glucuronoxilanas	15-30	D-Xylp	Ácido 4-O-metilglucurónico	α -1,2
Madeiras resinosas	Glucomananas	2-5	D-Manp D-Glcp	D-Galactose	α -1,6
	Galactoglucomananas	10-25	D-Manp	D-Galactose	α -1,6
	Arabinoglucuroxilanas	5-10	D-Glcp	Grupos acetilo	
			D-Xylp	Ácido 4-O-metilglucurónico	α -1,2
				L-Arabinose	α -1,3
Gramíneas e cereais	Glucomananas	2-5	D-Manp D-Glcp	D-Galactose	α -1,6
	Arabinoxilanas	15-30	D-Xylp	Resíduos de ácido ferúlico	α -1,2
					α -1,3
	Glucuroarabinoxilanas	15-30	D-Xylp	L-Arabinose	α -1,2
				Ácido 4-O-metilglucurónico	α -1,3

As hemiceluloses são bastante solúveis em ácidos ou soluções alcalinas, sendo hidrolisadas nos seus componentes monoméricos, apresentando uma estabilidade química e térmica inferior quando comparada com a celulose. Este facto deve-se ao seu fraco teor de cristalinidade e ao seu grau de polimerização mais baixo (Pereira, *et al.*, 2003).

Hidrolisando as hemiceluloses é possível obter uma solução que pode conter hexoses (glucose, galactose e manose), pentoses (xilose e arabinose) e quantidades reduzidas de outros açúcares como ácidos urónicos e ácido acético.

1.4. A cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), é uma planta monocotiledónea, semiperene, de ciclo fotossintético C4 (BNDES & CGEE, 2008), pertencente à família Poaceae (vulgarmente denominada família das gramíneas). Esta família apresenta uma elevada importância para a economia mundial, pelo facto de incluir as mais importantes espécies de cereais, tais como o milho, o trigo, e o arroz, bem como muitas outras culturas forrageiras (Tzvelev, 1989).

Do ponto de vista histórico, a cana-de-açúcar é originária da Nova Guiné, datando o seu primeiro registo de cerca de 2.500 a.C., onde era utilizada para construção de cercas e utilizado seu caldo açucarado. Entre 1.500 a.C. e 1.000 a.C. terá sido propagada para o continente Asiático, maioritariamente para a Índia e para a China. (Matsuoka *et al.*, 2005). Na América, a cana foi introduzida na primeira metade do século XVI, tornando-se a monocultura mais antiga explorada no Brasil, já que este país apresenta um clima ideal para o seu cultivo, com uma estação quente e húmida, viabilizando a germinação e o desenvolvimento vegetativo, seguida de outra fria e seca que proporciona maturação e a acumulação de sacarose no talo (BNDES & CGEE, 2008).

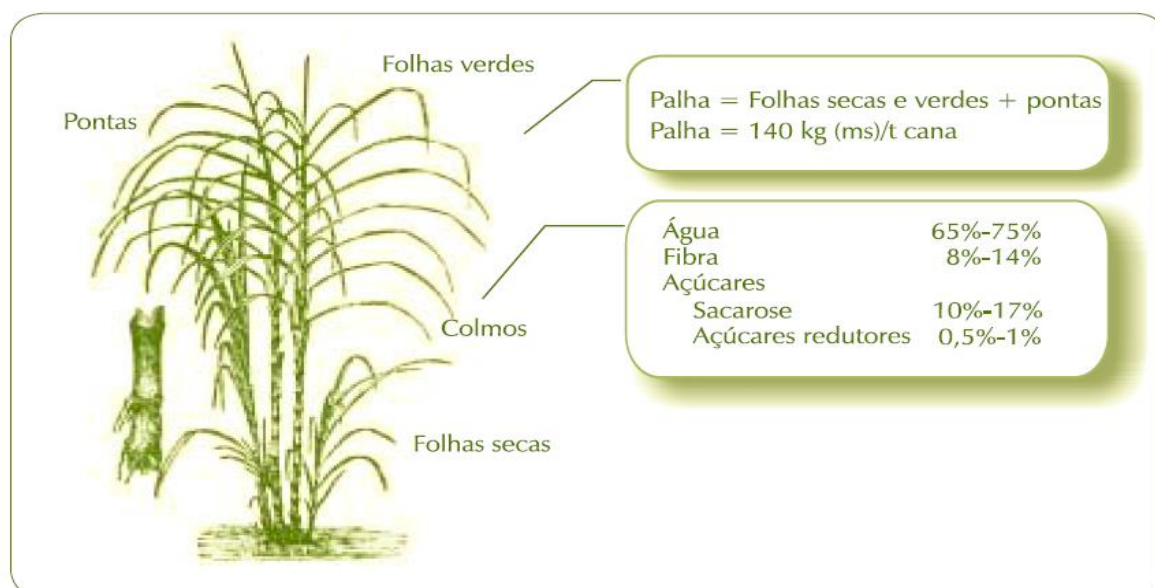


Figura 4- Esquema ilustrativo da constituição da cana-de-açúcar. Fonte: (BNDES & CGEE, 2008)

Ao longo do desenvolvimento seletivo efetuado durante séculos, a cana-de-açúcar passou por várias modificações, resultando em várias espécies amplamente cultivadas, variando principalmente no seu teor de fibra e de sacarose (Joaquim, 1997). Este desenvolvimento seletivo privilegiou características tais como o elevado teor em sacarose, resistência a doenças e produtividade. Atualmente, as variedades de cana-de-açúcar cultivadas industrialmente são híbridos resultantes de cruzamentos entre espécies do género *Saccharum*, predominando as contribuições génicas da espécie *S. officinarum* (Landell, 2010).

Morfologicamente, a cana-de-açúcar é composta por partes aéreas e subterrâneas, sendo a última composta por raízes e rizomas. A parte aérea é composta pelo colmo, onde se encontra concentrada a sacarose extraída na produção de açúcar de cana, pelas folhas e pontas. O caule caracteriza-se por ser um talo cilíndrico com nós internos ocos ou cheios, podendo apresentar rizomas, dividido em secções de comprimento de 5 a 30 cm. As folhas apresentam-se acopladas de forma alternada entre os nós do colmo, possuindo nervuras paralelas e uma nervura mediana principal (Wolf, 2011).

1.4.1. Panorama da plantação de cana-de-açúcar e dos seus maiores produtores

A cana-de-açúcar é cultivada em grande quantidade, principalmente nas zonas tropicais e subtropicais do globo, maioritariamente para a produção de açúcar comercial (sacarose). Deste modo, é uma das culturas comerciais mais importantes do globo, ocupando no ano de 2013 mais de 26 milhões de hectares de terra cultivada, resultando em mais de 2000 milhões de toneladas de cana produzida. O continente americano divide a liderança da produção com o continente asiático, tendo conjuntamente 94,2% da produção mundial (Figura 5) (FAOSTAT, 2013).

Em termos de países o panorama é notoriamente distinto. Destaca-se o Brasil como o maior produtor mundial, com 739 milhões de toneladas produzidas em 9,8 milhões de hectares de terreno cultivado em 2013.

No continente asiático destacam-se a Índia e as Filipinas como os maiores produtores, com valores de produção rondando os 320 milhões de toneladas no último ano (FAOSTAT, 2013).

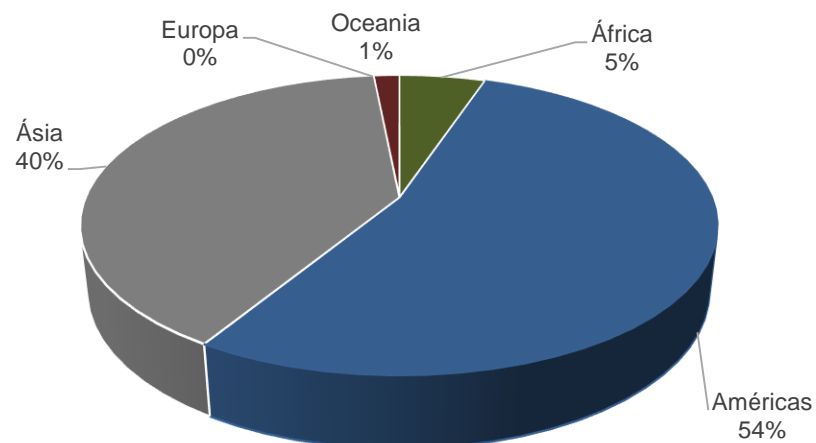


Figura 5 - Panorama global da produção mundial de cana-de-açúcar no ano de 2013. Fonte:(FAOSTAT, 2013).

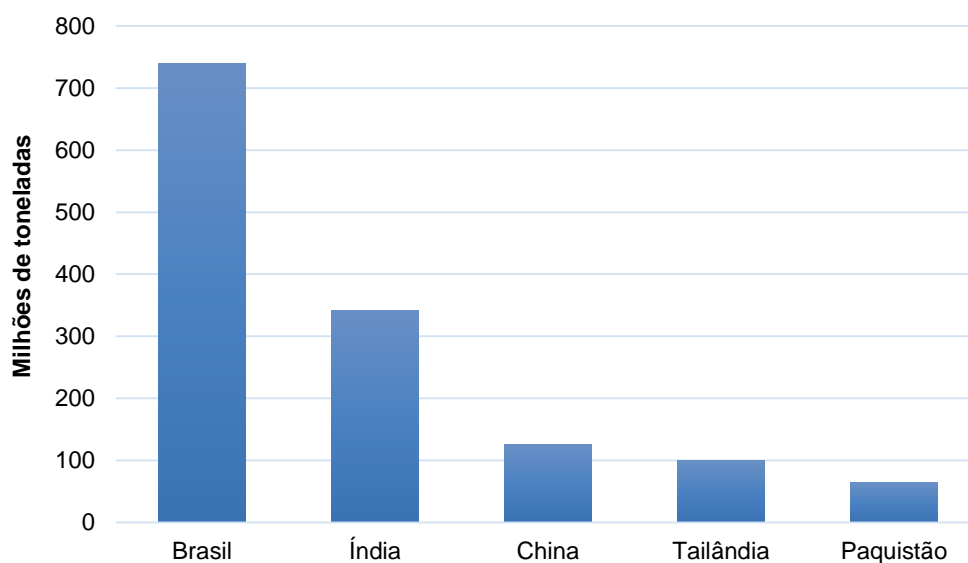


Figura 6 - Principais produtores mundiais de cana-de-açúcar e seus valores de produção em 2013. Fonte: (FAOSTAT, 2013)

Pelo facto do Brasil ser o maior produtor mundial, mas também devido a uma mudança de paradigma de produção e colheita efetuada pelo governo na última década, torna-se relevante estudar a cana brasileira mais pormenorizadamente. Tradicionalmente, a colheita de cana-de-açúcar era efetuada manualmente (colheita manual), sendo a colheita precedida de uma queima com o objetivo de eliminar a palha e as folhas secas (Figura 7). Com este

processo, descarta-se um reaproveitamento da palha sendo o trabalho do operador facilitado no corte das canas inteiras (Moraes, 2007). Contudo, a queima prévia levanta questões ambientais sérias devido à libertação dos gases de combustão como metano, azoto, monóxido de carbono, e outros gases responsáveis pelo efeito de estufa. Além da libertação destes gases, a queima diminui a matéria orgânica no solo, influenciando as características físicas, químicas e biológicas do mesmo, e interferindo na produção e longevidade do canavial (Araújo, 2013).



Figura 7- Colheita manual de cana-de-açúcar. Fonte: ("Crayonstock.com," 2014)

Na Figura 8 é possível observar a colheita mecanizada de cana-de-açúcar e a rejeição da palha, sendo esta deixada no campo. No Brasil, a legislação tem vindo a ser alterada, a fim de promover a eliminação gradual da queima da cana-de-açúcar e a passagem para um processo de colheita mecânica. Esse processo teve início fundamentalmente com o Decreto Federal nº 2.661, de 8/7/98 e pretende-se que esta mudança esteja concluída no ano de 2021 (BNDES & CGEE, 2008). Em 2007 vários estados brasileiros assinaram acordos com o sector açucareiro de modo a acelerar esse processo estabelecendo uma eliminação total da pré-queima até ao ano de 2014 (Moreno, 2011).



Figura 8 - Colheita mecanizada de cana-de-açúcar. Fonte: ("BC Rural," 2013)

A palha de cana-de-açúcar utilizada neste estudo resulta de uma colaboração com universidades colombianas, pelo que se torna relevante ilustrar um pouco do panorama deste país. Apesar de a produção ser bastante inferior à do Brasil, a Colômbia apresenta-se como um dos maiores produtores sul-americanos de cana-de-açúcar. No panorama sul-americano, ocupa o segundo lugar na tabela de maiores produtores, com 35 milhões de toneladas produzidas (Figura 9). A Argentina aparece como terceiro maior produtor sul-americano com 24 milhões de toneladas produzidas em 2013.

O cultivo de cana-de-açúcar colombiano é efetuado na sua maioria mecanicamente, graças à topografia plana das áreas de cultivo. As condições de solo, clima e acessibilidade conferem a este país uma capacidade de produção ao longo de todo o ano, resultando numa das produtividades mais elevadas em todo o mundo (Agriculture, 2007). A produção deste cultivar dá-se em 90% na área do vale do rio Cauca, sendo esta estimada em 227 mil hectares, resultando numa produção de 120 toneladas por hectare nesta região ("Colombia Sugar Annual 2013").

Nos últimos anos, a Colômbia tem alterado o seu panorama produtivo adotando uma visão modernizada e orientada para o futuro, olhando para a cana-de-açúcar também como uma alternativa energética viável, seguindo o exemplo brasileiro. Em 2006, diversas companhias açucareiras colombianas começaram a desviar parte da sua produção para o fabrico de bioetanol para ser incorporado em gasolina. Em 2007 esta perspetiva tornou-se lei, sendo obrigatório a todos os revendedores gasolineheiros a venda de combustível com 10%

de bioetanol incorporado, sendo este valor reduzido para 8% em anos seguintes. Esta alteração estrutural importantíssima causou uma expansão enorme na produção desta espécie vegetal. O exemplo mais emblemático é o aumento para 116 mil hectares da produção reservada à produção de etanol dos totais 740 mil hectares são cultivados no vale do Cauca (Gronewold, 2011).

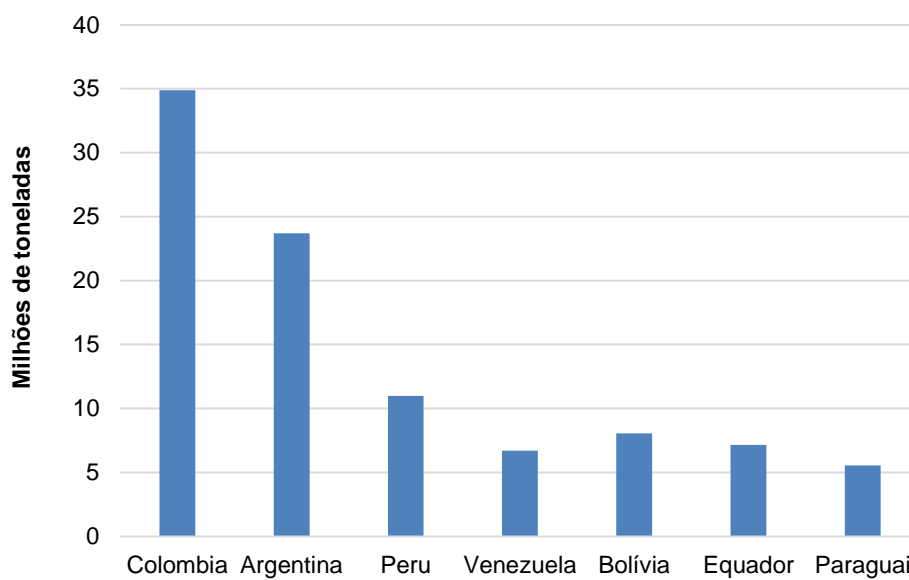


Figura 9 - Principais produtores de cana-de-açúcar Sul-americanos (exceto o Brasil), e seus valores de produção em 2013. Fonte: (FAOSTAT, 2013).

Contudo, apesar do crescimento acentuado desta indústria, 85% da colheita de cana-de-açúcar neste país é ainda manual. Os produtores refutam qualquer intenção de alterar o modo de colheita para a colheita mecanizada por receio de causar um surto de desemprego massivo na zona rural onde se dá o cultivo (Gronewold, 2011). Assim, os problemas com a palha de cana-de-açúcar excedentária não são tão preocupantes como noutros países, tais como o Brasil, mas não podem ser descartados uma vez que existe a intenção do governo colombiano em aumentar progressivamente a colheita mecânica.

Com a colheita manual a Colômbia tem vindo a sofrer problemas ambientais acentuados, principalmente devido à enorme quantidade de cinza libertada para a atmosfera que tem causado problemas de saúde graves na população (Cortés-betancourt, 2002). Este problema tem vindo a ser colmatado através do uso de previsões meteorológicas para tentar minimizar os danos da queima prévia da cana. Porém, com o contínuo aumento de produção

e expansão deste ramo industrial a tendência é a gradual conversão da colheita manual para mecanizada.

Deste modo, levanta-se o problema da remoção e aproveitamento da palha resultante da colheita mecanizada. A sua deposição no solo produz um efeito inibidor sobre o crescimento de espécies vegetais indesejadas e um efeito de controlo de erosão, mantendo ao mesmo tempo um teor de humidade no solo benéfico, atuando como fertilizante (Voll, 2005). Embora nem sempre exista consenso relativamente à quantidade de palha que deverá permanecer no campo para surtir o efeito desejado, os estudos mais pessimistas sugerem que apenas 50% da palha produzida será necessária (Alves, 2011), pelo que a questão do reaproveitamento da palha de cana-de-açúcar é um tema que urge explorar.

1.4.2. Palha de cana-de-açúcar

A definição de palha de cana-de-açúcar desperta alguma divergência. Num estudo datado de 2008, é apresentada uma diferenciação da palha de cana-de-açúcar dividindo-a em palha, palhada e palhiço. Deste modo, considera-se que a palha é constituída pelas folhas secas da cana, e a palhada sendo constituída pelos ponteiros e folhas de baixo teor de humidade recolhidas após a colheita. Considera-se o palhiço como sendo a palhada adicionada de frações de colmos, deixados na colheita, plantas daninhas e partículas de terra agregadas (Ripoli & Ripoli, 2008).

Estima-se que para cada tonelada de cana-de-açúcar colhida, 140 kg sejam referentes à palha (Hassuani *et al.*, 2005), ou seja 14%, e 240 a 300kg equivalem, após extração, a bagaço (Hugot, 1986). Contudo, o bagaço de cana é aproveitado em cerca de 90% para produção de energia, enquanto a palha é ainda totalmente desperdiçada (Seabra, 2008). Desta palha cerca de 50% é deixada no campo, pelo que por cada tonelada de cana produzida são produzidos 70 kg de palha excedentária (Alves, 2011).

Este tipo de matéria orgânica, sendo um material lenhocelulósico, como já descrito anteriormente, é constituída maioritariamente por celulose, lenhina e hemiceluloses. Deste modo, a palha de cana reúne as características ideais para ser uma matéria-prima que pode ser utilizada para vários fins, nomeadamente energéticos, para a produção de pasta para papel e ainda para a produção de outros materiais e químicos de elevado valor acrescentado. Em termos energéticos, a palha de cana é equiparável ao bagaço de cana mas, ao contrário deste último, é ainda praticamente toda desperdiçada. Em termos da sua aplicação mais imediata, esta biomassa pode ser utilizada como combustível, em substituição parcial ou total do bagaço, ou ainda como seu suplemento (Alves, 2011).

Porém, devido a quantidade crescente de palha produzida, outras utilizações estão a ser estudadas, tais como a produção de etanol de segunda geração ou a utilização na alimentação animal (Superbia & Paula, 2011).

1.5. Métodos de fracionamento de materiais lenhocelulósicos

No contexto das biorefinarias, para a valorização e aproveitamento dos materiais lenhocelulósicos é fundamental efetuar o seu fracionamento, através de processos habitualmente conhecidos como métodos de pré-tratamento. Na tabela 3 encontram-se representados alguns exemplos deste tipo de processos. O fracionamento da biomassa lenhocelulósica pode ser definido como um conjunto de processos físicos, químicos e/ou biológicos, efetuados de modo a obter uma separação seletiva dos diferentes componentes que a constituem.

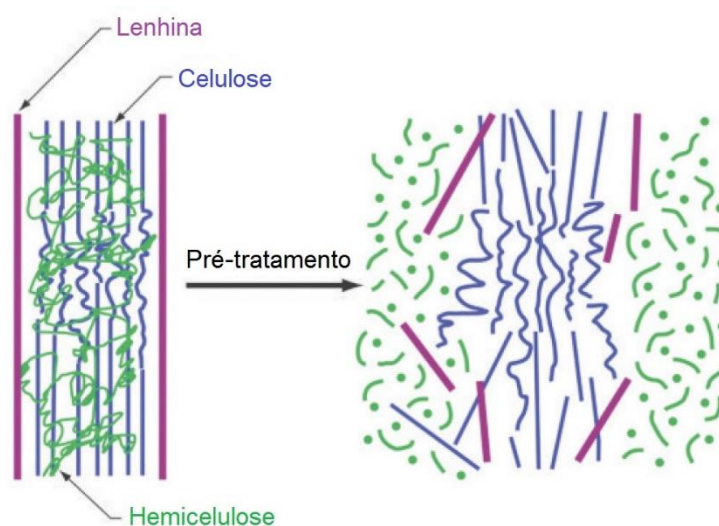


Figura 10 - Alterações estruturais no material lenhocelulósico causadas por pré-tratamento. Adaptado de (Hsu *et al.*, 1980)

O principal objetivo destes processos é conseguir uma separação eficiente das hemiceluloses, da celulose e da lenhina, evitando a formação de subprodutos indesejáveis como ácidos alifáticos e furanos (resultantes da degradação de açúcares) e de compostos fenólicos, minimizando os gastos energéticos e o recurso a produtos químicos.

Tabela 3 – Comparação de alguns processos utilizados para o fracionamento de materiais lenhocelulósicos. Adaptado de Carvalho *et al.* (2013).

	Ácidos		Sólidos	Alcalinos		Hidrotérmicos		Organosolv
	Diluído	Concentrado		Hidróxidos	AFEX	Auto-hidrólise	Explosão com vapor	
Temperatura	↑	↓/0	0	↓/0	0	↑	↑	↓/0/↑
Remoção da hemicelulose	↑	↑	EE	0	↓	↑	↑	↓/0
Recuperação da hemicelulose	↑	↓	EE	0	↓	↑	0	↓
Degradação da celulose	↓	↑	EE	↓	↓	↓	↓	↓
Digestibilidade enzimática	↑	N.A.	EE	↑	↑↑	↑	↑↑	0
Remoção da lenhina	↓	↓	↓↓	↑	↑	↓	↓	↑
Formação de inibidores	↓/0	↓/↑	↓	↓	N.A.	↓	↓/0	↓
Corrosão de equipamentos	0	↑	↓	↑	↑	↓	↓	0
Energia necessária	↑	↓	↓/0	↓	↑	↑	↑	↓/0/↑
Recuperação dos catalisadores	Difícil	Necessário	Fácil	Fácil	Necessário	N.A.	N.A.	Necessário
Formação de resíduos	↑	↓	N.A.	↓	N.A.	↓	↓	↓
Implementado à escala piloto	Sim	Sim	Não	Sim/Não	Não	Sim	Sim	Sim

↑, elevado; ↓, baixo; 0, moderado; EE, em estudo; N.A., não aplicável

Como se pode inferir pela análise da Tabela 3, não existe um processo ideal que possa satisfazer todos os requisitos ideais para um ótimo fracionamento de forma eficiente. Assim, é importantíssimo escolher, caso a caso, o método que mais se aplique aos objetivos pretendidos para o fracionamento do material pretendido.

Futuramente é previsível que venham a aparecer soluções de novos métodos ou métodos combinados e/ou sequenciais, que visem um fracionamento completo do material pretendido.

A principal limitação destes processos prende-se com a dificuldade em efetuar a separação de um componente maioritário sem que ocorra degradação dos restantes, pelo que é fundamental a utilização dos métodos de fracionamento seletivos bem como a otimização das respetivas condições operacionais de cada processo em função do objetivo pretendido (Taherzadeh & Karimi, 2004). A natureza química e física da lenhina, das hemiceluloses e da celulose dos materiais lenhocelulósicos, reduz substancialmente os métodos passíveis de aplicação para a separação seletiva dos seus polímeros constituintes.

Assim, existem alguns pré-tratamentos que permitem efetuar o fracionamento da biomassa, removendo por exemplo as hemiceluloses, reduzindo a cristalinidade da celulose e removendo a lenhina (Taherzadeh & Karimi, 2007). Consoante os reagentes hidrolíticos utilizados, estes métodos podem ser classificados como ácidos, hidrotérmicos, alcalinos e enzimáticos.

1.5.1. Métodos de fracionamento

A estrutura polimérica dos materiais lenhocelulósicos dificulta a utilização direta dos seus componentes pela maior parte dos microrganismos. Deste modo, torna-se então necessário recorrer a tratamentos de hidrólise dos polissacáridos de forma a tornar os seus monómeros acessíveis para a sua posterior utilização (Torrado, 2010). Estes métodos denominam-se métodos de fracionamento e têm como objetivo efetuar a hidrólise seletiva dos vários componentes do material utilizado, solubilizando os polissacáridos, e tornando os monossacáridos mais acessíveis.

Em geral, o primeiro passo do fracionamento (denominado pré-tratamento) consiste na hidrólise seletiva das hemiceluloses. Para além de remoção da hemiceluloses, este passo, permite uma maior exposição aos reagentes para o fracionamento dos restantes componentes, principalmente da celulose e lenhina.

Estes métodos podem apresentar alguma complexidade devido à heterogeneidade do meio reacional (Herrera *et al.*, 2004)

1.5.2. Métodos ácidos

Os processos de hidrólise ácida podem ser divididos em dois grandes grupos: a hidrólise com ácidos concentrados, e a hidrólise com ácidos diluídos. Para além da concentração do ácido utilizado, estes dois grupos diferem maioritariamente nas temperaturas usadas. Na hidrólise com ácidos concentrados são utilizadas temperaturas moderadas (acima de 30°C), enquanto na hidrólise com ácidos diluídos são utilizadas temperaturas elevadas (120 a 200°C). Nestes processos o ácido mais utilizado é o ácido sulfúrico, podendo ser também utilizados outros ácidos inorgânicos, como o ácido clorídrico (HCl), nítrico (HNO₃) e trifluoroacético (TFA) e também mais recentemente tem sido descrita a utilização de alguns ácidos fracos como o ácido fosfórico (Carvalho, Duarte, & Gírio, 2008; Gírio *et al.*, 2010).

Neste tipo de processos, as condições de operação são bastante variáveis consoante o objetivo pretendido. A celulose, devido à sua natureza cristalina e localização celular, encontra-se mais protegida no que diz respeito à hidrólise, proteção esta conferida devido à lenhina e à sua estrutura. Uma vez que, as hemiceluloses não possuem essa cristalinidade, é de esperar que estas sofram hidrólise e solubilização mais facilmente do que a celulose e do que a lenhina. Deste modo, é possível conferir seletividade à hidrólise ácida modificando as condições de operação consoante o efeito pretendido, tornando este tipo de processos bastante versátil. Assim, podem fracionar-se os materiais lenhocelulósicos recorrendo a ácidos diluídos, a temperaturas elevadas, solubilizando quase na totalidade as hemiceluloses, ou recorrendo a ácidos concentrados, em condições de temperatura moderada, provocando a hidrólise total da celulose e das hemiceluloses, permanecendo a lenhina como resíduo insolúvel (Sun & Cheng, 2002).

1.5.2.1. Hidrólise com ácidos concentrados

Os processos que utilizam ácidos concentrados podem ser bastante dispendiosos, sobretudo pelos problemas operacionais associados à corrosão dos equipamentos e à reciclagem do ácido. A utilização de ácidos concentrados permite a solubilização da celulose e das hemiceluloses, obtendo-se um resíduo sólido constituído principalmente por lenhina. A utilização deste tipo de ácidos promove a quebra das pontes de hidrogénio existentes nas

fibras de celulose, destruindo a sua cristalinidade. Neste caso, para obter a solubilização dos polissacáridos os ácidos mais utilizados são ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 72%, ácido clorídrico (HCl) a 41% ou ácido trifluoroacético (CF_3COOH) a 100% (Fengel, D. e Wegener, 1983).

A utilização de ácidos concentrados permite operar a temperaturas baixas (30-50°C), sob condições de pressão baixa, formando-se assim, sob condições controladas baixas quantidades de produtos de degradação durante a hidrólise. As baixas temperaturas e pressões permitem também uma redução dos custos relacionados com os equipamentos. Deste modo, é possível obter rendimentos elevados em açúcares em intervalos de tempo relativamente reduzidos (Goldstein, 1982; Wright, 1988a).

Para além da desvantagem da corrosão dos equipamentos, neste processo tem de existir uma preocupação fundamental na recuperação dos ácidos e na neutralização dos hidrolisados, representando desvantagens económicas e operacionais adicionais do processo. Estas desvantagens são relevantes quando comparadas com outros processos similares, tais como a hidrólise com ácidos diluídos ou métodos hidrotérmicos (Taherzadeh & Karimi, 2007).

1.5.2.2. Hidrólise com ácidos diluídos

A hidrólise com ácidos diluídos, também por vezes designada por pré-hidrólise ácida, é o método mais comum para a hidrólise das hemiceluloses, permanecendo a lenhina e a maior parte da celulose na fase sólida. Neste processo são utilizadas temperaturas elevadas, entre 120 e 200°C (Torget *et al.*, 1991). É provavelmente o processo mais utilizado em aplicações industriais pois, além dos custos relacionados com a sua utilização poderem ser relativamente reduzidos, permite obter rendimentos em açúcares elevados (em alguns casos próximo dos 100%) a partir de hemiceluloses (Carvalho *et al.*, 2008). Na hidrólise com ácidos diluídos o ácido mais utilizado, pelo seu custo reduzido e eficácia, é o H_2SO_4 (em concentrações entre 0,5 e 4%) embora também possam ser utilizados HCl , HNO_3 , HF e H_3PO_4 (Mosier, 2005; Parisi, 1989). Comparativamente ao método anterior, este método não apresenta nenhuma desvantagem no que diz respeito à corrosão elevada dos equipamentos, embora os custos de operação associados sejam elevados, nomeadamente aos custos associados aos próprios equipamentos usados (Sun & Cheng, 2002).

A hidrólise com ácidos diluídos é, em geral, a principal escolha para a hidrólise seletiva das hemiceluloses em monossacáridos, uma vez que é um método rápido e eficaz. Contudo, é necessário algum cuidado na otimização das condições operacionais de modo a aumentar a recuperação de monossacáridos e minimizar a formação de produtos de degradação. Estes

compostos, para além de reduzirem os rendimentos em açúcares são potencialmente inibidores do metabolismo microbiano, dificultando as fermentações posteriores (Carvalho, 2004).

Como resultado deste tipo de hidrólise e dependendo das condições operacionais, é possível obter monossacáridos, oligossacáridos, ácido acético e derivados furânicos resultantes da desidratação dos monossacáridos, e.g. furfural e 5-Hidroximetilfurfural (HMF), os quais podem ainda sofrer reações de decomposição, dando origem ao ácido fórmico (Dunlop, 1948) e ao ácido levulínico, respetivamente (Ulbricht *et al.*, 1984) (figura 11).

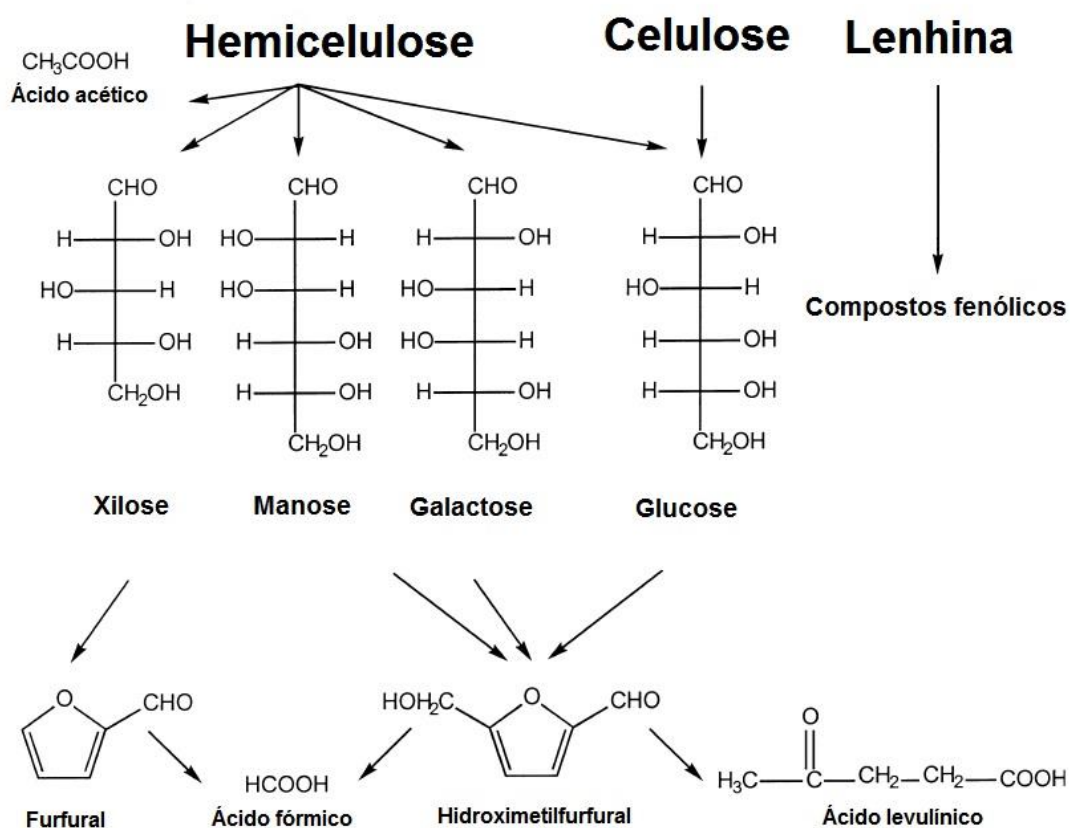


Figura 11 – Esquema dos principais produtos obtidos a partir dos materiais lenhocelulósicos, durante os processos de hidrólise (Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000).

1.5.3. Métodos hidrotérmicos

Os métodos hidrotérmicos são processos que se baseiam na utilização de água líquida ou vapor e calor para efetuar o tratamento da biomassa pretendido. O objetivo destes métodos, no geral, é permitir a hidrólise das hemiceluloses, deixando a celulose mais acessível para uma posterior hidrólise (Hörmeyer *et al.*, 1988). Comparando com os processos de hidrólise com ácidos diluídos, a principal diferença é que, nos métodos hidrotérmicos, a recuperação das hemiceluloses na fase líquida ocorre maioritariamente na forma oligomérica, enquanto nos processos utilizando ácido diluído, as hemiceluloses são recuperadas maioritariamente sob a forma dos seus monossacáridos constituintes.

Os métodos hidrotérmicos compreendem principalmente a auto-hidrólise, que utiliza água líquida e calor, e a explosão com vapor, que utiliza calor e vapor com explosão.

1.5.3.1. Auto-hidrólise

O método de auto-hidrólise é um método onde se utiliza água líquida e calor (temperaturas de 150 a 230°C) para o fracionamento de materiais lenhocelulósicos. Este tipo de tratamentos dão origem a hidrolisados, compostos maioritariamente por derivados de hemiceluloses (com rendimentos até 80%), e de um resíduo sólido constituído principalmente por celulose e lenhina, facilmente valorizável, por exemplo para produção de etanol celulósico (Boussarsar *et al.*, 2009; Carvalheiro *et al.*, 2008; Gírio *et al.*, 2010).

A auto-hidrólise é um processo cuja eficiência pode ser afetada por diversos fatores. Entre esses fatores encontram-se o tamanho das partículas do material, a razão líquido/sólido utilizada, a temperatura, tempo de reação e a natureza estrutural do material utilizado (Taherzadeh *et al.*, 1997; Vidal *et al.*, 2011). Na Tabela 4 são apresentados alguns exemplos das condições operacionais utilizadas para a auto-hidrólise de vários materiais.

No processo de auto-hidrólise, a hidrólise ocorre, numa primeira fase, pela ação dos iões H_3O^+ provenientes da auto-ionização da água, e numa fase seguinte, pelos iões H_3O^+ provenientes dos grupos acetilo das hemiceluloses que também atuam como catalisadores (Garrote *et al.*, 2002; Belkacemi *et al.*, 1991). As uniões éter heterocíclicas das hemiceluloses são as mais suscetíveis a este tipo de reação e a sua rutura conduz à formação de oligossacáridos com diferentes graus de polimerização. Dado que os açúcares obtidos se apresentam maioritariamente na sua forma oligomérica. Este processo pode ser um método preferencial para a obtenção de oligossacáridos, que apresentam diversas alternativas de aproveitamento, principalmente como compostos prébióticos (Moura *et al.*, 2007).

Tabela 4 – Exemplos de condições operacionais utilizadas em tratamento de auto-hidrólise de diversos materiais lenhocelulósicos.

Matéria-prima	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Tamanho partícula (mm)	Razão líquido/sólido (g/g)	Referência
Madeiras					
Carvalho	230	4	4	10	(Carrasco <i>et al.</i> , 1994) ^a
Eucalipto	230	2	4	10	(Carrasco <i>et al.</i> , 1994) ^a
Pinheiro (<i>Pinus pinaster</i>)	190	8	4	10	(Carrasco <i>et al.</i> , 1994) ^a
Pinheiro (<i>Pinus sivestris</i>)	210	4	4		(Carrasco <i>et al.</i> , 1994) ^a
Resíduos agrícolas					
Bagaço de cana-de-açúcar	150-170	^a	0,8	5-10	(Saska & Ozer, 1995) ^a
Bagaço de sorgo sacarino	230	0,5	4	10	(Carrasco <i>et al.</i> , 1994) ^a
Carolo de milho	180-223	3-5	-	-	(Ropars <i>et al.</i> , 1992) ^a
Casca de amêndoa	180-200	1-68	0,25	3	(Martínez <i>et al.</i> , 1995) ^a
Casca de sementes de girassol	200	5	1	-	(Dekker & Wallis, 1983) ^a
Palha de trigo	190	8	4	10	(Carrasco <i>et al.</i> , 1994) ^a
Palha milho	150-240	^a	6 mm	10	(Moniz <i>et al.</i> , 2013)
Bagaço de azeitona	150-230	^a	1-3,55	3-10	(Fernandes <i>et al.</i> , 2012)

^a Adaptado de (Garrote *et al.*, 1999)

Comparativamente a outros tratamentos, este processo possui bastantes vantagens. Em primeiro lugar a questão da corrosão dos equipamentos é bastante reduzida, e por outro lado a reciclagem dos ácidos e a remoção de precipitados não existe neste processo. Assim,

este processo torna-se vantajoso a nível económico, industrial e ambiental (Kubikova *et al.*, 1987).

Dependendo das condições operacionais, os principais produtos da auto-hidrólise são uma mistura de oligossacáridos (OS), monossacáridos, ácido acético e produtos de degradação tal com referido anteriormente para a hidrólise com ácido diluído. Este tipo de tratamento leva também à obtenção de resíduos sólidos compostos maioritariamente por celulose e lenhina (Boussarsar *et al.*, 2009). Tipicamente, e ao contrário da hidrólise com ácidos diluídos, a auto-hidrólise caracteriza-se pelo facto da produção de oligossacáridos ser superior à de monossacáridos. Além disso, este processo por utilizar apenas água, calor e biomassa dá origem a uma menor formação de produtos de degradação.

1.5.3.2. Explosão com vapor

O processo de explosão com vapor é um processo físico-químico que utiliza vapor de água saturado para o aquecimento, o que permite uma velocidade de transferência de calor elevada. Este tratamento caracteriza-se por submeter o material lenhocelulósico a altas pressões (20 a 50 bar) e altas temperaturas (160 a 240°C), durante um curto período de tempo (por vezes segundos). Após a exposição do material, este é sujeito a uma descompressão rápida, na qual a água contida nas fibras do material vaporiza, resultando numa explosão (Sun & Cheng, 2002). Deste modo, dá-se uma desagregação da matriz lenhocelulósica do material, rompendo ligações intra- e intermoleculares, resultando numa degradação do material. Este método é fundamentalmente utilizado como pré-tratamento, precedendo a hidrólise enzimática da celulose. A sua utilização como método para obtenção de hidrolisados hemicelulósicos tem a desvantagem de conduzir a uma degradação dos açúcares relativamente elevada (Sun & Cheng, 2002) quando comparado, por exemplo, com a auto-hidrólise ou hidrólise com ácidos diluídos.

1.5.4. Métodos alcalinos

A solubilização e hidrólise do material lenhocelulósico pode ocorrer também em meio alcalino. Estes processos afetam fundamentalmente a lenhina e em menor grau as hemiceluloses. Neste tipo de processo os reagentes mais utilizados são hidróxidos (NaOH e KOH) em concentrações na gama dos 2 a 18%, utilizando condições de pressão e temperatura moderadas (Baudel, 2006).

Em alternativa existem ainda outros processos que utilizam amónia, por exemplo AFEX (*Ammonia Fibre Explosion*) e ARP (*Ammonia Recycling Process*) (Wyman *et al.*, 2005). O AFEX, em particular, tem suscitado grande interesse pelo facto de permitir uma digestibilidade enzimática da celulose elevada com uma formação muito baixa de produtos de degradação. No entanto os custos do processo não permitem ainda a sua utilização a nível industrial.

Em geral, os processos alcalinos caracterizam-se por ser menos seletivos que os referidos anteriormente, afetando fundamentalmente a lenhina e em menor grau as hemiceluloses. Além disso, conduzem também a uma redução da cristalinidade da fração celulósica, causando um aumento da superfície de contacto e da porosidade desse material (Baudel, 2006). Este processo possui algumas desvantagens relacionadas principalmente com a dificuldade de recuperação dos reagentes alcalinos de modo a garantir a viabilidade económica do processo. Ainda assim, o facto de na maior parte dos casos permitir operar a baixas temperaturas e pressões constitui uma grande vantagem pois permite a redução dos custos do equipamento.

1.5.5. Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática é o processo utilizado, em geral, para hidrolisar as frações celulósicas e/ou hemicelulósicas recorrendo a enzimas celulolíticas e/ou xilanolíticas. É um dos processos mais utilizados para efetuar a hidrólise da fração celulósica, pois pode permitir a conversão quase total da celulose em glucose (Alvira *et al.*, 2010; Rossberg *et al.*, 2014).

É um processo que pode ser usado como complemento dos processos referidos anteriormente, de modo a hidrolisar a fração celulósica obtida nos seus monómeros (glucose), para que esta possa ser aproveitada noutros processos, especialmente por processos utilizando microrganismos (Palmqvist, 2000) tais com a produção de etanol e ácidos orgânicos (lático, succínico) (Fengel & Wegener, 1983; Heitz *et al.*, 1991; Laser *et al.*, 2002).

Este processo requer a ação sinérgica de três enzimas: endoglucanase, exoglucanase (celobiohidrolase) e β -glucosidase. As endoglucanases quebram as ligações glucosídicas das cadeias de celulose criando novos terminais; exo-1,4- β -D-glucanases ou celobiohidrolases, responsáveis pela ação nos terminais levando à formação de celobiose; e 1,4- β -D-glucosidases que hidrolisam a celobiose em glucose. As endo-1,4- β -glucanases ou 1,4- β -D-glucana-4-glucano-hidrolases (EC 3.2.1.4) atuam aleatoriamente nas regiões amorfas da celulose, hidrolisando ligações glucosídicas β -(1,4) (Lynd *et al.*, 1999). As celobiohidrolases (exo-1,4- β -D-glucanases, EC 3.2.1.91) atuam nos terminais redutores das

cadeias de celulose, ocorrendo a formação de D-celobiose. As “ β -D-glucosidases” ou β -D-glucó-hidrolases (EC 3.2.1.21) catalisam a hidrólise em unidades monoméricas de D-glucose a partir da celobiose e celodextrinas solúveis.

A eficiência destes processos, depende não só da ação sinérgica das várias enzimas mas fundamentalmente do pré-tratamento anterior efetuado ao material lenhocelulósico, pois uma vez que a celulose não se encontra facilmente acessível à ação enzimática, o pré-tratamento facilitará a sua ação de modo que a despolimerização ocorra em tempo útil (Wright, 1988b). Em geral, esses pré-tratamentos conduzem à solubilização das hemiceluloses, à qual se associa o aumento da digestibilidade enzimática da celulose (Grohmann *et al.*, 1985; Chum *et al.*, 1988). O principal efeito desta remoção de hemiceluloses parece ser o aumento de volume dos poros e o conseqüente aumento da área superficial exposta à ação enzimática (Grethlein & Converse, 1991).

As principais vantagens deste processo consistem na utilização de temperaturas moderadas, em meios não corrosivos, estando estas intimamente ligadas às vantagens económicas do processo (baixo custo energético e de equipamento). Contudo, este tipo de processo possui desvantagens que se prendem principalmente com o custo das enzimas, da sua recuperação, e do facto de ser demorado quando comparado com outros processos (Duarte *et al.*, 2004).

1.5.6 Processos *Organosolv*

Os processos *organosolv* são processos que utilizam um solvente ou misturas de solventes orgânicos, juntamente com água, de modo a efetuar a remoção de lenhina. Este pré-tratamento é normalmente usado como um processo de deslenhificação, no qual, aos solventes utilizados, podem ser adicionados catalisadores a diferentes temperaturas para otimizar o tratamento. Dependendo das condições utilizadas, para além da deslenhificação, pode também ocorrer alguma degradação de compostos fenólicos ou dos polissacáridos, em particular das hemiceluloses (Buranov & Mazza, 2008).

Neste tipo de tratamento, os solventes mais usualmente utilizados são álcoois e cetonas. As temperaturas utilizadas dependem dos solventes e das matérias-primas utilizadas. Geralmente, temperaturas entre os 150 e 200°C podem ser usadas com ou sem adição de catalisadores como os ácidos orgânicos ou inorgânicos (Bozell *et al.*, 2011; Toledano *et al.*, 2012).

Do ponto de vista operacional, a grande vantagem deste tipo de processo reside no facto de produzir lenhina de alta qualidade com custos relativamente reduzidos quando comparado com processos enzimáticos, por exemplo. Contudo, o solvente utilizado pode ter efeitos inibitórios em passos utilizados subsequentemente (Harmsen *et al.*, 2011). Assim, a remoção e recuperação dos solventes são passos recomendados de forma a reduzir os custos e o impacto ambiental que poderia originar (Sun & Cheng, 2002).

Face aos métodos mais tradicionais, os processos *organosolv* apresentam grandes vantagens a nível ambiental e a nível da sua aplicabilidade numa gama extensa de matérias-primas (El Hage *et al.*, 2010; Huijgen *et al.*, 2012; Mesa *et al.*, 2011; Sindhu *et al.*, 2012). Para além disso, são grandes vantagens, o facto de se conseguirem obter lenhinas com menores percentagens de enxofre, menor teor em cinzas, maior pureza (devido ao menor teor de hidratos de carbono), e, em geral, menor peso molecular. As lenhinas obtidas por estes processos são também, mais hidrofóbicas e menos degradadas, resultando desta forma uma maior possibilidade de poderem ser utilizadas posteriormente para produtos de valor acrescentado, principalmente, devido ao grau de pureza ser elevado (Bozell *et al.*, 2007)(Sidrach, 2010).

Nos processos *organosolv* o objetivo pode ser a solubilização da lenhina com obtenção de sólidos ricos em celulose para uma hidrólise enzimática posterior. Na deslenhificação *organosolv* são utilizados solventes orgânicos, tais como álcoois (metanol, etanol, butanol), acetona e ácidos orgânicos (fórmico, acético) responsáveis pelas clivagens das ligações éter da lenhina, podendo ou não ser utilizados juntamente com outros catalisadores (HCl, H₂SO₄, CaCl₂, entre outros) (Stewart, 2008). Desta forma é obtida uma lenhina denominada lenhina *organosolv* ou lenhina *acetosolv* (no caso da utilização de ácido acético). Os solventes utilizados neste processo apresentam, em geral, baixos pontos de ebulição podendo ser recuperados por destilação, são os casos do etanol ou acetona.

1.5.7 Fator de severidade

A composição química dos hidrolisados hemicelulósicos obtidos, por exemplo através da auto-hidrólise da biomassa vegetal varia de acordo com uma série de fatores tais como a natureza da matéria-prima, temperatura utilizada no processo de hidrólise e tempo de reação. A temperatura utilizada, por exemplo, influencia fortemente a concentração dos produtos de degradação presentes no hidrolisado (Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000).

Para determinar as condições operacionais ótimas do tratamento de hidrólise para um material lenhocelulósico em particular, é necessário estabelecer a relação entre as variáveis do processo e as modificações químicas que ocorrem no substrato.

Os parâmetros de severidade, que procuram combinar num único parâmetro empírico o efeito das diferentes variáveis operacionais constituem um ferramenta útil para interpretar os efeitos dos pré-tratamentos nos materiais. Estes parâmetros incluem a temperatura e o tempo como principais variáveis do processo para monitorizar a extensão da conversão ou rendimento em produtos. O parâmetro R_0 é denominado ordenada de reação, proposto por (Overend & Chornet, 1989) é traduzido pela seguinte expressão:

$$R_0 = \int_0^t \exp\left(\frac{T - 100}{w}\right) \cdot dt$$

Sendo T a temperatura da reação ($^{\circ}\text{C}$), t o tempo de residência (min), 100 a temperatura de referência ($^{\circ}\text{C}$), temperatura abaixo do qual se considera não ocorrer hidrólise e w um parâmetro empírico relacionado com a energia de ativação, e que habitualmente se assume o valor de 14,75.

A utilização do parâmetro de severidade apresenta diversas vantagens, não só por permitir a fácil comparação dos resultados obtidos em equipamentos e condições diferentes, mas também porque permite facilmente a transposição de condições de operação para escalas superiores (*scale-up*).

1.6 Objetivos

Pelo exposto anteriormente, torna-se relevante estudar e otimizar as condições operacionais de auto-hidrólise que permitam um fracionamento seletivo da palha de cana-de-açúcar. É de particular importância para esta valorização a obtenção de hidrolisados ricos xilo-oligossacáridos, com diversas aplicações. É também relevante a caracterização dos sólidos pré-tratados por auto-hidrólise bem como o estudo da sua sacarificação, com vista a avaliar o seu potencial para a produção de biocombustíveis (como por exemplo o bioetanol) ou outras aplicações.

2. Materiais e Métodos

2.1 Matéria-prima

A palha de cana-de-açúcar utilizada neste trabalho foi fornecida pela empresa Ingenio Mayagüez (Colômbia). Após colheita, o material foi lavado com água à temperatura de 60°C, seco e acondicionado em recipientes adequados até utilização.

2.2. Caracterização granulométrica da matéria-prima

Para a caracterização granulométrica da matéria-prima utilizada (palha de cana-de-açúcar) foram efetuados três ensaios de separação com um agitador de peneiros (Endecotts, ECVS1, Inglaterra), em tomas de 50 g e com a duração de 20 min, utilizando 8 peneiros de 20,3 cm de diâmetro (Retsch, ASTM E11, Alemanha). Os peneiros utilizados foram colocados em série, por ordem crescente de diâmetro de poro, conforme indicado na Tabela 5.

Tabela 5 - Lista de peneiros utilizados para a caracterização granulométrica.

Peneiros	Diâmetro do poro (mm)
1	0
2	0,25
3	0,355
4	0,5
5	0,710
6	1
7	2
8	4

Após os três ensaios, foi calculada a percentagem de matéria-prima correspondente a cada fração. O cálculo do diâmetro médio das partículas foi efetuado segundo a expressão:

$$D_p = \frac{\sum x_i d_i^4}{\sum x_i d_i^3}$$

Onde,

xi - Fração de partículas retidas em cada peneiro

di – Diâmetro médio das partículas retidas em cada peneiro

2.3. Fracionamento seletivo da palha de cana-de-açúcar

2.3.1. Auto-hidrólise

O processo de auto-hidrólise foi efetuado utilizando um reator de aço inoxidável com uma capacidade de 600 mL (Parr Instruments Company, Moline, Illinois, EUA). Os tratamentos foram efetuados em condições não-isotérmicas, a temperaturas entre 170 e 230°C. A temperatura e pressão durante os tratamentos foram controladas recorrendo a um controlador PID, modelo 4842 (Parr Instruments Company, EUA).

Para cada tratamento foram pesadas aproximadamente 23 g de palha da cana-de-açúcar (peso seco), adicionando em seguida uma massa de água destilada de modo a obter uma razão líquido-sólido (RSL) de 10 (g água/g biomassa seca).

No início do tratamento foi selecionada a temperatura final para o respetivo ensaio e colocada a manta de aquecimento, ligando-se em seguida o sistema de agitação que utiliza um impulsor de 2 turbinas com 4 pás planas. A agitação utilizada nos tratamentos foi de 150 rpm. Para cada tratamento foram traçados os perfis de aquecimento e de pressão, durante a sua duração total. Ao atingir a temperatura pretendida no tratamento, foi efetuado um arrefecimento gradual do reator até uma temperatura de 25°C, com recurso à remoção da manta de aquecimento e da circulação de água fria nas serpentinas internas do reator, presentes para esse efeito. Por fim, procedeu-se à abertura do reator e à separação da fase líquida (licor) e da fase sólida, por prensagem até 200 kgm⁻² (prensa Sotel, Portugal). Após prensagem, o licor obtido foi filtrado (filtro Whatman nº1) e armazenado a 4°C para posteriores análises. A fase sólida foi lavada com água destilada, colocada em caixas de papel e seca numa estufa (Memmert, Alemanha) a 50°C, durante 48 h. Após pesagem, a sua humidade foi determinada, conforme descrito em 2.4.1, e uma fração foi moída num moinho de facas (IKA WERKE, Alemanha), e modo a obter partículas de dimensão inferior a 0,5 mm para posterior caracterização química.

O factor de severidade tal como proposto por Overend e Chornet (1987), foi calculado pela seguinte expressão:

$$\exp \left[\frac{\left(\frac{T-100}{t*14,75} \right) * t}{\frac{T-100}{t*14,75}} \right] \quad \text{Equação 34}$$

Onde,

-T é a temperatura (°C)

-t é o tempo (min)

14,75- Parâmetro empírico relacionado com a energia de ativação e com o tipo de processo.

2.3.2. Hidrólise enzimática

O procedimento de hidrólise enzimática, aplicado à matéria-prima (2.1) e aos resíduos sólidos provenientes do processamento hidrotérmico (2.3.1), foi executado com base no protocolo do NREL (Selig *et al.*, 2008). Os ensaios foram realizados em frascos cilíndricos de fundo concavo em plástico de 40 mL com tampa, tendo-se normalizado a quantidade de sólido em cada ensaio (0,15 g de biomassa em base seca). À amostra de biomassa foram adicionados 5 mL do tampão citrato de sódio (0,1 M) a pH 4,8, 100 µL de uma solução de azida de sódio, como agente anti-microbiano (2% m/V) e a suspensão de enzimas Celluclast 1,5L e Novozyme 188 (Novozymes, Dinamarca), na dose de 42 FPU/g de celulose e 64 pNPGU/g de celulose, respetivamente. Seguidamente, per fez-se o volume com água destilada até 10 mL.

Fizeram-se os respetivos brancos de enzimas (sem biomassa) e brancos de biomassa (sem enzimas), de modo a corrigir os resultados para os sacarídeos livres presentes na biomassa e os produtos que pudessem eventualmente formar-se na ausência das enzimas.

Os frascos foram fechados e colocados numa incubadora Comecta, a 50°C, durante 72 h, sob agitação orbital (250 rpm). Terminada a reação, as amostras foram colocadas num banho (Memmert, Concessus S.A.R.L, Portugal) de água em ebulição, durante cerca de 5 min, para inativar as enzimas. Seguidamente, as amostras foram filtradas sob vácuo utilizando filtros Millipore® de poro 0,45 µm. O licor foi analisado por HPLC (2.4.6). A percentagem de sacarificação foi determinada através da expressão:

$$\% \text{ de sacarificação} = \frac{\text{Celulose Sacarificada (g)}}{\text{Celulose Inicial (g)}} \times 100$$

2.4. Métodos analíticos

2.4.1. Determinação da humidade

Para a determinação da humidade das amostras, foram utilizadas caixas de níquel, taradas numa estufa a 100°C durante 16 h, seguido do seu arrefecimento durante 1 h num exsiccador e pesagem numa balança analítica (Mettler HK 160, Suíça). Após efetuada a tara das caixas, foi pesada 1 g de amostra e colocada em estufa a 100°C durante 16 h, seguido de arrefecimento em exsiccador e nova pesagem. A determinação da humidade das amostras foi efetuada em duplicado e sempre que necessário para as técnicas utilizadas.

2.4.2. Determinação da cinza

Para proceder à determinação da cinza da matéria-prima, foram tarados cadinhos de porcelana numa mufla (Heraeus D-6450, Alemanha) a 550°C durante 16 h, seguido do arrefecimento em exsiccador e respetiva pesagem. Em seguida foi pesado, para cada cadinho 1 g de amostra e, em seguida, os cadinhos foram colocados numa placa de aquecimento de modo a efetuar uma pré-queima, e por fim foram colocados novamente na mufla a 550°C durante, pelo menos, 5 h. Após este passo, os cadinhos foram novamente arrefecidos num exsiccador e pesados. A quantidade de cinza foi determinada através do cálculo da diferença entre o peso final dos cadinhos e a sua tara. Esta técnica foi realizada para cada amostra em duplicado.

2.4.3. Determinação do peso seco dos hidrolisados

Após a realização de cada tratamento hidrotérmico foi determinada a percentagem de sólidos (resíduo seco) dos hidrolisados resultantes com determinação da humidade das amostras, tendo sido utilizadas 5 g de hidrolisado em cada ensaio. Esta determinação foi efetuada em duplicado para todas as amostras.

2.4.4. Determinação de compostos extratáveis

Para efetuar a determinação de compostos extratáveis foi utilizado o método Tappi T 204 cm-97 (extrativos em diclorometano) e o protocolo do NREL (Sluiter *et al.*, 2008), utilizando como solventes diclorometano, etanol e água por esta ordem.

Para tal foram pesadas para cartuchos 2 g de amostra as quais foram colocadas num Soxhlet de 125 mL e extratadas com 190 mL do respetivo solvente sucessivamente com diclorometano (durante 6 h), etanol (durante 18 h) e água (durante 18 h). O teor de extrativos (em cada solvente) foi calculado com base na determinação da massa seca de cada extrato (após evaporação até em estufa a 100°C até à secura).

2.4.5. Determinação do teor proteico

O teor proteico presente na matéria-prima foi determinado através do método de Kjeldahl (AOAC, 2000) recorrendo a um analisador de proteína semiautomático Kjeltect, Tecator (Suécia). Em tubos de digestão foram colocados 0,5 g de amostra, tendo-se adicionado 10 g de mistura catalisadora e 20 mL de H₂SO₄ concentrado (96% m/m). As amostras preparadas foram colocadas na unidade de aquecimento do aparelho de digestão (Digestion System 6 Modelo 107, Tecator). Seguidamente colocaram-se as cápsulas do sistema de extração de fumos e abriu-se a fonte de vácuo. Após os primeiros 30 min do processo, a temperatura foi elevada até 420°C, durante 1,5 h. Terminada a digestão, e após arrefecimento do conteúdo dos tubos, adicionou-se 100 mL de água destilada a 50 mL de ácido bórico 4% (m/V). Em seguida colocaram-se os tubos na unidade de destilação (Kjeltect System modelo 1026, Tecator). Durante esta operação de destilação foi libertado amoníaco, por adição da solução de NaOH (50% m/V), arrastado por uma corrente de vapor de água sendo depois recolhido na solução de ácido bórico. O amoníaco foi detetado através de uma titulação ácido-base, utilizando HCl 0,1 M como titulante, situando-se o ponto de viragem do indicador de pH usado num valor de pH de 4,8.

2.4.6. Quantificação de monossacáridos, ácidos alifáticos e compostos furânicos por HPLC

Nos hidrolisados foram quantificadas as concentrações de D-glucose, D-xilose, L-arabinose, ácido acético, ácido fórmico, ácido levulínico, 5-hidroximetilfurfural (HMF) e furfural nos licores durante a auto-hidrólise e nas amostras provenientes da caracterização dos

polissacarídeos estruturais ou oligossacáridos. Esta quantificação foi realizada por HPLC (Agilent 1100 Series, Waldbronn, Alemanha) utilizando uma coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad, EUA). Antes da análise, todas as amostras foram previamente filtradas através de filtros Millipore® de diâmetro de poro 0,20 µm. Os monossacáridos e os ácidos alifáticos foram quantificados utilizando o detetor de Índice de refração (IR), enquanto o furfural e o HMF foram quantificados a 280 nm recorrendo ao detetor de fotodíodos (DAD).

As concentrações dos compostos analisados foram calculadas a partir de curvas de calibração, traçadas a partir de soluções padrão, numa gama de concentrações que variou, no máximo entre 0,1-20 g/L.

Tabela 6 - Características da coluna cromatográfica HPX-87H e respetivas condições operacionais de análise.

Dimensões da coluna	300 x 7,8 mm
Fase móvel	H ₂ SO ₄ 5 mM
Caudal	0,6 mL/min
Volume de amostra	5 µL
Temperatura da coluna	50°C
Temperatura do detetor IR	50°C
Comprimento de onda UV	280 nm

2.4.7. Determinação de polissacáridos, grupos acetilo e lenhina *Klason*

A matéria-prima e os resíduos sólidos obtidos após auto-hidrólise foram sujeitos a um processo de hidrólise ácida quantitativa, de acordo com uma adaptação do protocolo do NREL (Sluiter *et al.*, 2008). Foram pesados cerca de 0,5 g de amostra para tubos de ensaio de 2 cm de diâmetro, aos quais se adicionaram 5 mL de H₂SO₄ 72% (m/m). Em seguida, os tubos de ensaio foram colocados num banho termostatzado (Mettmert, Alemanha) a 30 °C,

durante 1 h, com agitação ocasional, utilizando uma vareta de vidro. Seguidamente, o conteúdo dos tubos foi transferido para frascos (Schott, Alemanha) de 250 mL e foi adicionada água destilada, de maneira a diluir o ácido até uma concentração de 4% (V/V).

Em seguida, os frascos foram colocados na autoclave (Uniclave, Portugal) durante 1 h a uma temperatura de 121 °C. Após arrefecimento, procedeu-se à filtração da mistura recorrendo a cadinhos de placa porosa (porosidade 3), previamente secos na mufla, como descrito anteriormente.

O resíduo depositado nos cadinhos foi lavado com 100 mL de água destilada, restando assim a lenhina *Klason* determinada após secagem e corrigida por subtração do valor das cinzas (como descrito anteriormente). A fase líquida obtida foi analisada por HPLC nas condições descritas na Tabela 6, exceto que o volume de injeção foi de 20 µL e o caudal de 0,4 mL/min. Para cada amostra o ensaio foi realizado sempre em duplicado.

O cálculo das percentagens dos polímeros e grupos acetilo foi efetuado com base nas concentrações de glucose, xilose, arabinose e ácido acético presente nos licores.

2.4.8. Determinação do teor de oligossacáridos

O doseamento de OS nos licores de auto-hidrólise seguiu o protocolo do NREL (Sluiter *et al.*, 2005). Foi pesada 1 g de H₂SO₄ (72% (m/m)) para frascos Schott de 100 mL de capacidade, adicionando-se em seguida uma quantidade de licor suficiente para obter uma concentração final de H₂SO₄ de 4% (m/m).

Em seguida as amostras preparadas foram autoclavadas a 121 °C durante 1 h. Após arrefecimento, as amostras foram filtradas através de filtros Millipore® de diâmetro de poro 0,20 µm para serem posteriormente analisadas por HPLC (2.4.6). Este procedimento foi sempre efetuado, pelo menos, em duplicado.

As concentrações dos oligossacáridos foram calculadas a partir do aumento da concentração dos monossacáridos presentes (quantificada por HPLC) após a hidrólise ácida dos licores relativamente aos licores de auto-hidrólise.

2.4.9 Cálculos da caracterização química da matéria-prima e resíduos sólidos

As concentrações de glucose, xilose, arabinose e ácido acético nos licores resultantes da hidrólise ácida quantitativa da matéria-prima e resíduo sólido foram utilizados para o

cálculo das percentagens de glucano, xilano, arabinano e grupos acetilo, respetivamente (Equações 1 a 5). O resíduo insolúvel em ácido, após correção da cinza, permitiu o cálculo da lenhina *Klason* (Equação 5).

Na hidrólise ácida quantitativa uma pequena percentagem de açúcares é degradada, por isso são introduzidos fatores de correção para corrigir as perdas. De acordo com Browning essas perdas são de 2,6% para a glucose, 8,8% para a xilose e 4,7% para a arabinose. Com base nestas percentagens é possível calcular os fatores de correção (F), que permitem corrigir as várias determinações.

$$Gn = F \times \frac{100}{1005} \times \frac{162}{180} \times \frac{Glc \times P_{sol}}{A}$$

Equação 1

$$Xn = F \times \frac{100}{1005} \times \frac{132}{150} \times \frac{Xyl \times P_{sol}}{A}$$

Equação 2

$$Arn = F \times \frac{100}{1005} \times \frac{132}{150} \times \frac{Ara \times P_{sol}}{A}$$

Equação 3

$$GAc = \frac{100}{1005} \times \frac{60}{61} \times \frac{Ac \times P_{sol}}{A}$$

Equação 4

$$LK = \frac{RIA - C}{A} \times 100$$

Equação 5

- Gn, Xn, Arn, GAc, LK são as percentagens de glucana, xilana, arabinana, grupos acetilo e lenhina *Klason*, respetivamente (g /100 g sólido),

- F é o fator de correção, por exemplo, para a glucana, $F = 1/(1-0,026) = 1,027$,

- P_{sol} e A são as massas de solução e da amostra seca utilizada no ensaio, respetivamente (g),

- RIA e C são as massas do resíduo insolúvel em ácido e da cinza da amostra, respetivamente (g),

- Glc, Xyl, Ara e Ac são as concentrações de glucose, xilose, arabinose e ácido acético nos licores (g·L⁻¹).

2.4.10 Cálculo de rendimentos

O rendimento de cada um dos polímeros, expresso como a percentagem que permanece no resíduo sólido relativamente à respetiva percentagem na matéria-prima, após hidrólise ácida foi calculada de acordo com as Equações 6 a 16.

$$Gn_R = \frac{Gn \times Y_S}{Gn_{MP}} \quad \text{Equação 6}$$

$$Xn_R = \frac{Xn \times Y_S}{Xn_{MP}} \quad \text{Equação 7}$$

$$Arn_R = \frac{Arn \times Y_S}{Arn_{MP}} \quad \text{Equação 8}$$

$$GAc_R = \frac{GAc \times Y_S}{GAc_{MP}} \quad \text{Equação 9}$$

$$LK_R = \frac{LK \times Y_S}{LK_{MP}} \quad \text{Equação 10}$$

- Gn_R, Xn_R, Arn_R, GAc_R, LK_R são as percentagens de cada um dos “polímeros” que permanecem no resíduo após o tratamento (g /100 g de polímero na matéria-prima),

- Gn_{MP}, Xn_{MP}, Arn_{MP}, GAc_{MP}, LK_{MP} são as percentagens de glucana, xilana, arabinana, grupos acetilo e lenhina *Klason* na matéria-prima, respetivamente (g /100 g matéria-prima),

- Y_S – rendimento em sólidos (g /100 g matéria-prima).

$$Glc_R = \frac{162}{180} \times \frac{Glc \times P_H}{Gn_{MP} \times A \times 0,01\rho_H} \times 100$$

Equação 11

$$Xyl_R = \frac{132}{150} \times \frac{Xyl \times P_H}{Xn_{MP} \times A \times 0,01\rho_H} \times 100$$

Equação 12

$$Ara_R = \frac{132}{150} \times \frac{Ara \times P_H}{Arn_{MP} \times A \times 0,01\rho_H} \times 100$$

Equação 13

$$Ac_R = \frac{60}{61} \times \frac{Ac \times P_H}{GAc_{MP} \times A \times 0,01\rho_H} \times 100$$

Equação 14

$$Furf_R = \frac{132}{96} \times \frac{Furf \times P_H}{Xn_{MP} \times A \times 0,01\rho_H} \times 100$$

Equação 15

$$HMF_R = \frac{162}{126,1} \times \frac{HMF \times P_H}{Gn_{MP} \times A \times 0,01\rho_H} \times 100$$

Equação 16

- Glc_R , Xyl_R , Ara_R , Ac_R , $Furf_R$, HMF_R , são as percentagens de glucose, xilose, arabinose, ácido acético, furfural e HMF recuperados no hidrolisado (g /100 g de polímero),
- $Furf$ e HMF são as concentrações de furfural e HMF nos licores ($g \cdot L^{-1}$),
- P_H é a massa de hidrolisado obtido no ensaio (g),
- A é a massa de amostra utilizada no ensaio (g),
- ρ_H é a massa volúmica do hidrolisado ($g \cdot g \cdot L^{-1}$).

A percentagem de cada um dos “polímeros” relativamente ao total de amostra inicial foi calculada de acordo com as Equações 17 a 21.

$$Gn_T = \frac{Gn_R \times Gn_{MP}}{100}$$

Equação 17

$$Xn_T = \frac{Xn_R \times Xn_{MP}}{100}$$

Equação 18

$$Arn_T = \frac{Arn_R \times Arn_{MP}}{100}$$

Equação 19

$$GAc_T = \frac{GAc_R \times GAc_{MP}}{100}$$

Equação 20

$$LK_T = \frac{LK_R \times LK_{MP}}{100}$$

Equação 21

- Gn_T , Xn_T , Arn_T , GAc_T , LK_T são as percentagens de cada um dos “polímeros” (g /100 g de matéria-prima).

As percentagens de glucose, xilose, arabinose, ácido acético, fórmico e levulínico, furfural, HMF e compostos fenólicos relativamente ao total de amostra inicial foram calculadas de acordo com as Equações 22 a 28.

$$Glc_T = \frac{Glc_R \times Glc_{MP}}{100}$$

Equação 22

$$Xyl_T = \frac{Xyl_R \times Xyl_{MP}}{100}$$

Equação 23

$$Ara_T = \frac{Ara_R \times Ara_{MP}}{100}$$

Equação 24

$$Ac_T = \frac{Ac_R \times Ac_{MP}}{100}$$

Equação 25

$$Furf_T = \frac{Furf_R \times Furf_{MP}}{100}$$

Equação 26

$$HMF_T = \frac{HMF_R \times HMF_{MP}}{100}$$

Equação 27

$$CFn_T = \frac{CFn_R \times P_H}{\rho_H \times A} \times 100$$

Equação 28

- Glc_T, Xyl_T, Ara_T, Ac_T, Furf_T, HMF_T e CFn_T são as percentagens de glucose, xilose, arabinose, ácido acético, furfural, HMF e compostos fenólicos (g /100 g de matéria-prima),
- CFn é a concentração de compostos fenólicos presentes no hidrolisado (g·L⁻¹).

2.4.11. Quantificação da atividade das enzimas comerciais

A determinação das atividades enzimáticas das enzimas comerciais (Celluclast 1.5L e Novozyme 188) utilizadas para avaliação da digestibilidade enzimática é fundamental para determinar o volume necessário de cada enzima, de forma a respeitar a padronização requerida no protocolo. Assim, as atividades enzimáticas presentes, atividade total de celulase (FPase), endoglucanase e β-glucosidase, foram quantificadas de acordo com o protocolo do NREL (Adney & Baker, 2008), o protocolo descrito em (Ghose, 1987) e o protocolo descrito em (Berghem & Pettersson, 1974), respetivamente. Uma Unidade Internacional de atividade de FPase (FPU), endoglucanase e de β-glucosidase (IU) liberta 1 μmol de glucose ou PNP (*p*-nitrofenol) por minuto, nas condições do ensaio (Ghose, 1987)(Adney & Baker, 2008).

A determinação das atividades foi realizada em tubos de ensaio, onde são adicionadas as enzimas, sob diferentes diluições, em tampão citrato 0,05 M pH 4,8 (devem ser realizadas pelo menos duas diluições de cada enzima) adicionando o respetivo substrato (ver Tabela 7). Seguidamente, os tubos de ensaio, são fechados e incubados a 50°C, (para o tempo de incubação, ver tabela 7). Terminada a reação, as amostras são colocadas num banho de água em ebulição, durante cerca de 5 min, para inativar as enzimas. A concentração de glucose libertada é medida pelo método do DNS (Anexo II) recorrendo ao espectrofotómetro JASCO. A libertação de PNP é também medida espectrofotometricamente a 400 nm.

Paralelamente, fizeram-se os respetivos brancos de substrato (sem enzimas) e brancos de enzimas (sem substrato), sendo este último apenas necessário quando a glucose está presente nas enzimas estudadas e/ou quando são utilizadas diluições mais baixas (Ghose, 1987).

Na tabela 7 encontram-se os respectivos volumes de enzima a adicionar, a solução substrato utilizada, bem como, o respectivo volume e o tempo de incubação.

Tabela 7 – Condições de determinação das atividade enzimáticas de FPase, celobiase e endoglucanase para preparação dos ensaios de sacarificação.

Enzimas	Volume enzima (mL)	Substrato	Tempo de incubação (min)
Fpase	0,5 ^a	50 mg Papel de filtro Whatman nº1	60
Endoglucanase	0,2 ^b	1,8 mL Carboximetilcelulose (2%)	10
β-glucosidase (celobiase)	1 ^a	1 mL de PNPG (5mM)	10

a As diluições devem ser feitas de forma a obter cerca de 2 mg de glucose

b As diluições devem ser feitas de forma a obter cerca de 0,5 mg de glucose

No Anexo II, também se encontram descritos os cálculos para a determinação das atividades enzimáticas para as três enzimas.

2.4.12. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Foi efetuada a caracterização espectroscópica das seguintes amostras: tal qual, pré-tratada a 210°C e pré-tratada a 230°C, por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Foi usado um espectrómetro FTIR Espectro BX, Perkin Elmer, Inc. (San José, CA, EUA), equipado com um detetor DTGS e divisor de feixe com KBr. Os espectros foram adquiridos na região 4000-400 cm⁻¹, com um total de 32 scans e uma resolução de 4 cm⁻¹ com recurso ao *software* Espectro (versão 5.3.1, Perkin Elmer, Inc., San Jose, CA, EUA).

Inicialmente realizou-se um branco que corresponde aos valores de absorção do ar e aos espectros das amostras foi subtraído o espectro do branco.

As amostras foram previamente extratadas conforme descrito em 2.4.4 e foi misturado $1,00 \pm 0,05$ mg de amostra com 50 mg de KBr. Em seguida a mistura foi moída num almofariz durante 10 min até obter uma mistura homogénea. As amostras foram prensadas a uma pressão de 8,5 ton durante 5 min. Este procedimento foi realizado para todas as amostras de forma igual, por forma a minimizar os erros experimentais associados à preparação das mesmas.

3. Resultados e discussão

3.1. Caracterização da matéria-prima

Para melhor conhecer a natureza da matéria-prima utilizada no processo de auto-hidrólise fez-se sua caracterização física e química, de modo a melhor compreender o comportamento e os efeitos do material utilizado nos tratamentos testados.

3.1.1. - Caracterização granulométrica

Neste trabalho, fez-se uma caracterização granulométrica após a moagem do material a partículas de tamanho igual ou inferior a 6 mm, determinando-se as percentagens de cada uma das frações granulométricas utilizando peneiros com tamanhos de poro entre 4 e 0,25 mm. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na Figura 12.

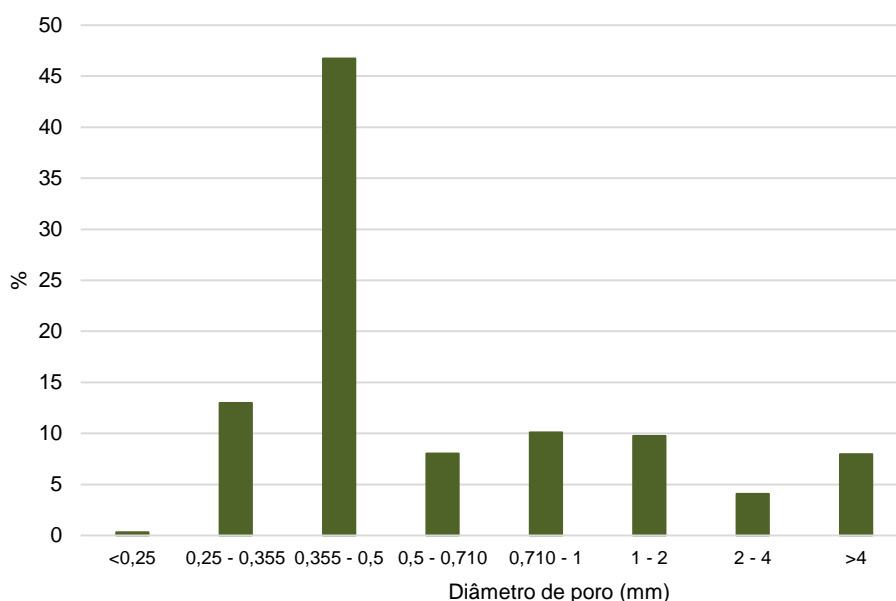


Figura 12 – Caracterização granulométrica da palha de cana-de-açúcar utilizada.

A palha de cana-de-açúcar apresenta frações predominantemente de dimensões entre 0,355 e 0,5 mm, correspondendo a cerca de 46% do total analisado. A fração correspondente às partículas de menor dimensão (< 0,25 mm) apresenta um valor muito baixo (0,3%), o que mostra que este material apresenta uma percentagem de finos muito

reduzida. Este valor contrasta com o que se encontra descrito para outras palhas tais como a palha de milho (Moniz *et al.*, 2013), ou *switchgrass* (*Panicum virgatum*) (Bridgeman *et al.*, 2007), podendo constituir uma grande vantagem para o processamento deste material. A fração de maiores dimensões (> 2mm) correspondeu a 12,1% do material, enquanto a fração intermédia (entre 2 e 0,5 mm) representou 27,9%. O diâmetro médio obtido para esta palha foi de 0,528 mm.

Como a fração não ultrapassou 50% e a percentagem de fios é muito baixa, optou-se pela utilização de todas as frações granulométricas.

3.1.2. Caracterização química

A composição química dos materiais lenhocelulósicos varia com a sua origem, espécie, clima ou com as condições de cultivo. Estas variações ocorrem principalmente nos teores de hemiceluloses, celulose e lenhina, se bem que a composição das hemiceluloses varia com a natureza do material. Na Tabela 8 apresenta-se a composição química da palha de cana-de-açúcar utilizada neste trabalho.

Tabela 8 – Composição química da palha de cana-de-açúcar.

Componentes	(%)
Glucanas	39,58
Xilanas	21,74
Arabinanas	4,73
Grupos acetilo	2,03
Lenhina <i>Klason</i>	18,56
Proteína	0,23
Cinza	10,54
Extratáveis	13,55

A celulose (estimada a partir do teor de glucanas) é o principal componente da palha de cana-de-açúcar (39,6%), seguido das hemiceluloses com 28,5%, estimada a partir dos valores de xilanas, arabinanas e grupos acetilo obtidos. Comparativamente a outras palhas,

os valores de glucanas obtidos para a palha de cana-de-açúcar apresentam-se ligeiramente superiores aos reportados na bibliografia para outras palhas (capítulo 1.3, Tabela 1), tais como, as de trigo e as de cevada (31,5 e 30,8% respetivamente) (Nabarlatz *et al.*, 2007), mas semelhantes aos da palha de milho (42,1%) (Moniz *et al.*, 2013; Silva, 2013). O teor de glucana observado foi semelhante ao descrito para bagaço de cana-de-açúcar (Geddes *et al.*, 2011; Imman *et al.*, 2013).

Já no que se refere ao teor de hemiceluloses, os valores obtidos assemelham-se aos descritos para a palha de milho (26,3-29,2%) (Moniz *et al.*, 2013; Silva, 2013) e bagaço de cana-de-açúcar (Gonçalves *et al.*, 2005), embora ligeiramente superiores a outros obtidos para as palhas de trigo, de cevada e de arroz (25,2%, 25,3% e 25,23% respetivamente) (Nabarlatz *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2010). O teor de arabinose obtido foi superior ao das palhas referidas anteriormente (1,6% na palha de arroz e 3% nas restantes). Em contraste, o teor de grupos acetilo foi inferior ao das outras palhas, exceto a palha de arroz (1,5%). Comparando com outros valores descritos na bibliografia para a palha de cana-de-açúcar, o teor de polissacáridos encontrados (68,1%) é semelhante (Santos *et al.*, 2012).

Os valores obtidos para a lenhina Klason são característicos de materiais com um teor em lenhina médio-baixo, e são semelhantes aos previamente descritos para bagaço de cana-de-açúcar (Gonçalves *et al.*, 2005) e outras palhas, tais como as palhas de trigo, milho e arroz (Carvalho *et al.*, 2009; Nabarlatz *et al.*, 2007; Moniz *et al.*, 2013; Silva, 2013), mas inferiores à palha de cana-de-açúcar (Santos *et al.*, 2012; Gonçalves *et al.*, 2005).

Em termos de cinza, os valores encontrados são elevados e superiores aos previamente descritos na bibliografia para outras palhas (Nabarlatz *et al.*, 2007; Silva, 2013; Moniz *et al.*, 2013), mas inferiores aos valores descritos para a palha de arroz (Zhong *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2010; Moniz *et al.*, 2014). Estes valores são também bastante superiores aos previamente descritos para o bagaço de cana-de-açúcar (apenas 2%) (Gonçalves *et al.*, 2005).

É de notar que o balanço somativo dos compostos da palha de cana-de-açúcar ultrapassa os 100%, o que pode, em parte, dever-se a erro experimental. O facto da hidrólise ácida quantitativa, para quantificação dos polissacáridos e lenhina Klason não ter sido feita na amostra livre de extrativos pode, no caso de estarem ainda presentes alguns açúcares livres, fazer com que estes possam ter sido quantificados como extrativos e como contribuição para os polissacáridos.

O conjunto de resultados obtidos para a caracterização química da palha de cana-de-açúcar, nomeadamente o seu teor elevado em polissacáridos, sugerem a adequação deste

material para valorização no contexto das biorrefinarias, nomeadamente para valorização no âmbito da plataforma bioquímica.

3.2. Auto-hidrólise

3.2.1. Perfis de auto-hidrólise

A palha de cana-de-açúcar foi submetida a tratamentos hidrotérmicos de auto-hidrólise até temperaturas finais entre 170°C e 230°C (condições não-isotérmicas). Para cada um dos tratamentos foram traçados perfis de aquecimento registando-se a temperatura e simultaneamente a pressão correspondente. Estes perfis poderão ser úteis para verificar a reprodutibilidade dos tratamentos, e para certificar que os diferentes efeitos detetados após os tratamentos se devem às diferentes condições utilizadas e não a uma variação anómala de temperatura e pressão durante o tratamento, garantindo assim a possibilidade de comparar resultados.

Na Figura 13 são apresentados os perfis de temperatura e pressão para a auto-hidrólise da palha de cana-de-açúcar a diferentes temperaturas. Os perfis traçados são todos bastante semelhantes, seguindo a mesma tendência, indicando assim uma elevada reprodutibilidade para as condições do processo. Os perfis de aquecimento seguem um comportamento próximo de um perfil sigmoide enquanto os perfis de pressão apresentam uma tendência exponencial. Tal como para a temperatura, estes perfis são bastante semelhantes, seguindo a mesma tendência, pelo que não se verificaram anomalias na pressão registada em nenhum dos tratamentos e está garantida uma elevada reprodutibilidade. Dada a grande proximidade dos valores de pressão e temperatura registados em cada um dos tratamentos, é possível atribuir os diferentes efeitos registados nas análises subsequentes aos parâmetros dos tratamentos e não a diferenças no comportamento do equipamento.

Após a realização dos tratamentos, os licores obtidos foram analisados a fim de quantificar os açúcares solúveis obtidos na forma de oligossacáridos (XOS – xilo-oligossacáridos, e gluco-oligossacáridos – GlcOS), monossacáridos (xilose, arabinose e glucose), ácidos alifáticos (ácidos acético, fórmico e levulínico) e compostos furânicos (5-hidroximetilfurfural e furfural). As concentrações de GlcOS e XOS foram calculadas a partir das diferenças entre as concentrações dos monossacáridos correspondentes presentes nos licores da pós-hidrólise ácida dos mesmos e os licores resultantes de auto-hidrólise. Para o

cálculo dos teores de GlcOS foram utilizados os valores das concentrações de glucose enquanto que os teores de XOS foram calculadas com base nas concentrações de xilose e arabinose.

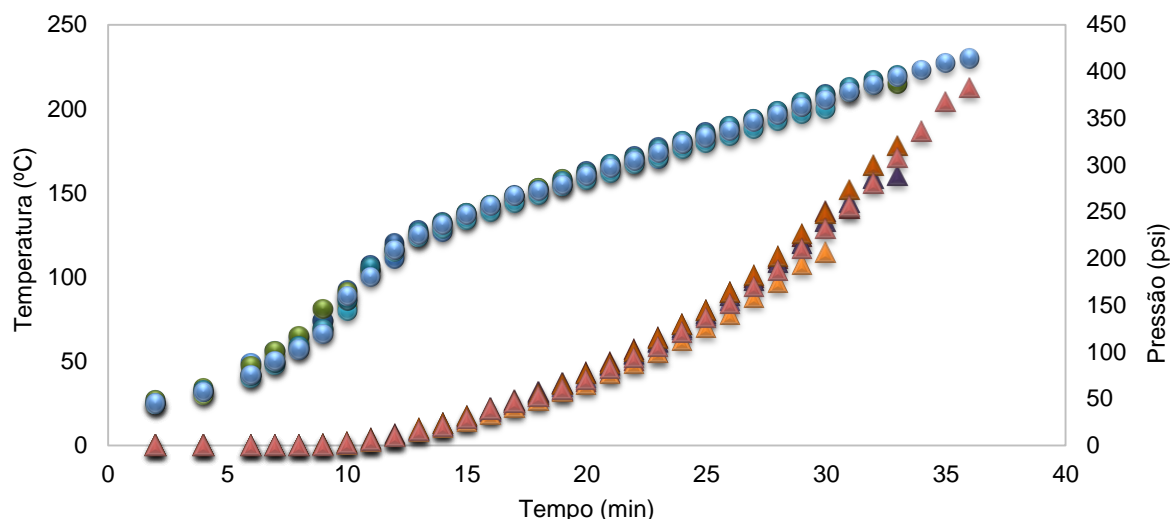


Figura 13 - Perfis de temperatura (●) e pressão (▲) obtidos para a auto-hidrólise da palha de cana-de-açúcar.

Os produtos obtidos, assim como as suas concentrações após os tratamentos térmicos, variam grandemente dependendo das condições utilizadas. Em geral, os tratamentos hidrotérmicos, caracterizam-se ou poderão ser otimizados para uma hidrólise seletiva das hemiceluloses. Na Figura 14 é possível verificar o efeito dos tratamentos realizados nas hemiceluloses do material.

Em primeiro lugar, é possível constatar que as hemiceluloses presentes na fase sólida decresceram, comparativamente às hemiceluloses do material inicial (28,5%), indicando uma solubilização das mesmas, que se torna acentuada para condições de maior severidade ($\text{Log } R_0$ superior a 3,25), chegando aos 100% para as temperaturas de 220 e 230°C ($\text{Log } R_0$ 4,13 e 4,44, respetivamente). No que respeita à recuperação de hemiceluloses na fase líquida, verifica-se que para as temperaturas mais baixas os valores de pentoses monoméricas (xilose e arabinose) e oligoméricas foram reduzidos (5,6 g/100 g de palha), representando 21,3% da hemicelulose inicial. À medida que a temperatura final do tratamento aumenta, e consequentemente a severidade, ocorre um aumento da produção de xilo-oligossacáridos (XOS), atingido um máximo para a temperatura de 210°C ($\text{Log } R_0=3,85$) e que corresponde a uma recuperação de XOS, relativamente à (arabino)xilana inicial, de 47,6% (12,6 g/100 g

matéria-prima inicial). A partir deste valor observa-se uma diminuição de oligossacáridos, devido à sua degradação, ocorrendo por isso um aumento da produção de monossacáridos e furfural

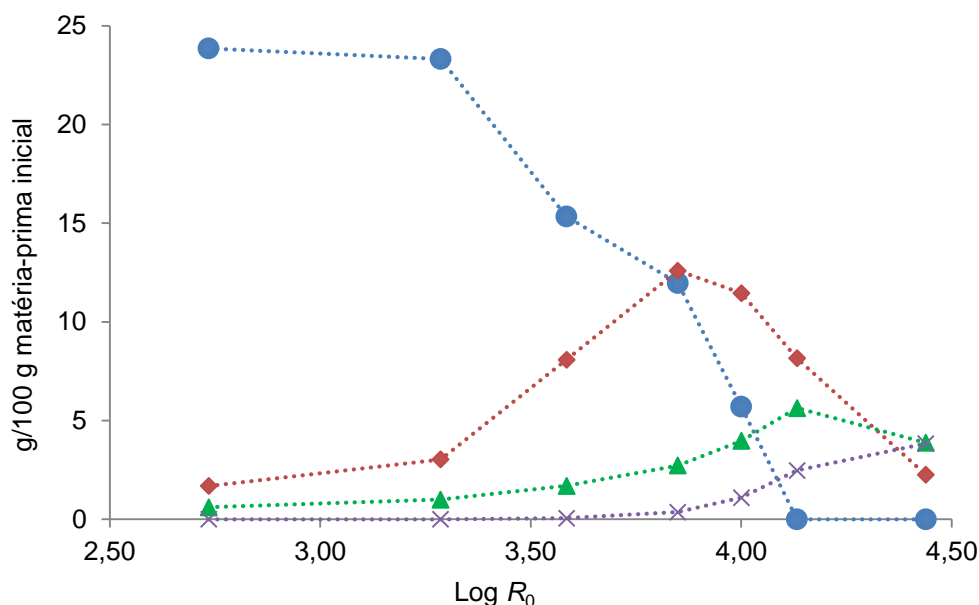


Figura 14 - Efeitos da auto-hidrólise no rendimento em (arabino)xilanas (●), na fase sólida, xilo-oligossacáridos (◆), pentoses monoméricas (▲) e furfural (×) na fase líquida

O rendimento máximo de XOS obtido foi semelhante ao obtido por outros autores para a auto-hidrólise de palha de cevada mas inferior ao obtido para a palha de trigo (50-55%) (Carvalho *et al.*, 2009) e para a palha de milho, quando utilizadas condições idênticas (Silva, 2013; Moniz *et al.*, 2013).

No caso das pentoses monoméricas, o seu rendimento aumentou com o aumento da temperatura final dos tratamentos, sendo o valor mais elevado obtido para 220°C (log $R_0=4,13$), correspondendo a 5,64 g/100 g de matéria-prima inicial (51,98 g/100 g arabino(xilana)). A produção de pentoses totais é, no entanto, mais elevada (Figura 15). O valor máximo foi obtido a 215°C (log $R_0 = 4,00$) com 59,38 g/100 g de (arabino)xilana inicial, valor este ligeiramente superior ao obtido na condição ótima para a recuperação de XOS (57,78 g/100g de (arabino)xilana inicial).

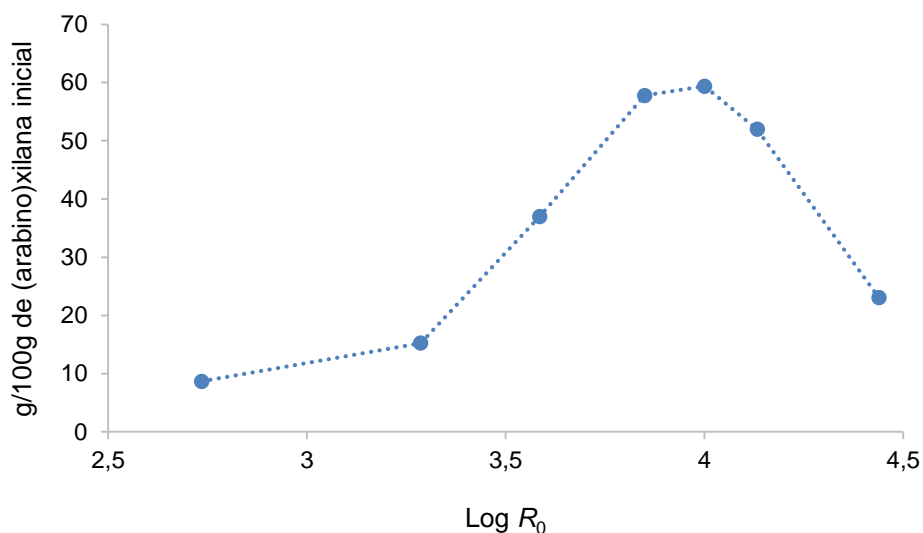


Figura 15 - Efeitos da auto-hidrólise no rendimento em pentoses totais.

Na condição mais severa constatou-se um decréscimo na concentração de pentoses na fase líquida, explicado por reações de degradação e pelo aumento da produção de furfural, que apresentou uma baixa produção até à temperatura de 210°C (0,37 g/100 g de matéria-prima inicial). Porém, acima desta temperatura as concentrações de furfural denotam um acréscimo relativamente elevado, chegando a 3,83 g/100 g. Assim, é possível depreender um acréscimo de reações de degradação nos tratamentos acima dos 210°C, corroborado pelo aumento de furfural, pelo decréscimo de oligossacáridos e de pentoses monoméricas no licor (na temperatura final de 230°C).

Deste modo, a melhor condição para a obtenção de hemiceluloses solúveis, na forma oligomérica, a partir da auto-hidrólise da palha de cana-de-açúcar, corresponde a uma temperatura de 210°C. Nestas condições, a concentração de furfural (importante composto e inibidor) apresenta valores bastante reduzidos.

Na Figura 16 estão representadas os rendimentos de glucana, e dos produtos derivados da sua hidrólise: gluco-oligossacáridos (GlcOS), glucose e 5-hidroximetilfurfural (HMF). Neste caso, o efeito do tratamento hidrotérmico é completamente distinto do que se observou para as hemiceluloses.

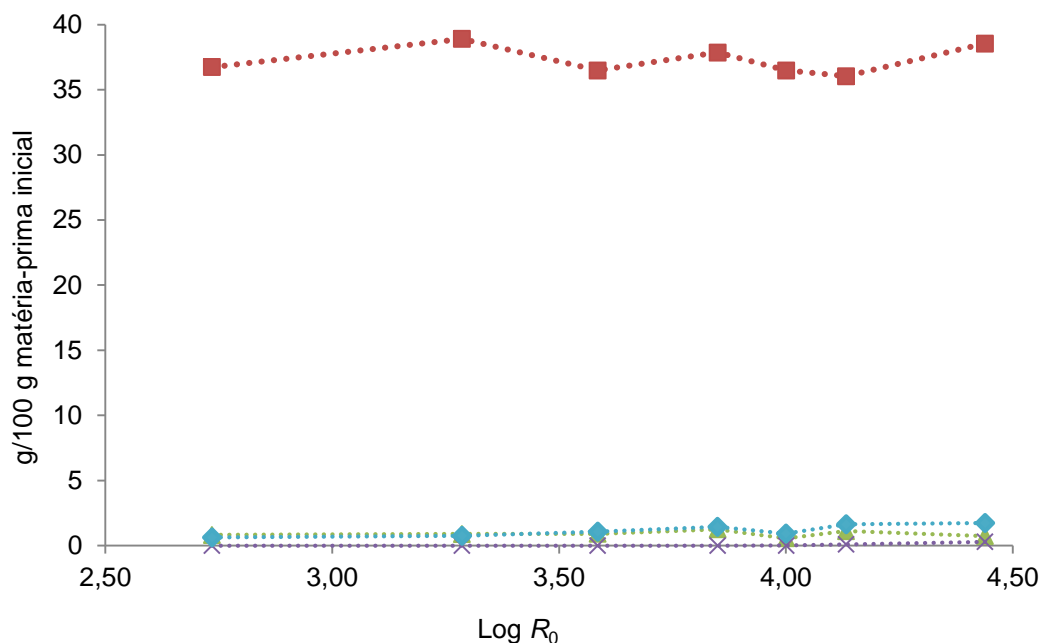


Figura 16 – Efeitos da auto-hidrólise no rendimento em glucanas (■), gluco-oligosacáridos (▲), glucose (◆) e HMF (X).

Tal como geralmente acontece neste tipo de tratamentos, desde que sejam convenientemente seleccionadas as condições operacionais, as glucanas praticamente não foram afetadas. O rendimento em glucanas manteve-se praticamente estável obtendo-se uma solubilização máxima de apenas 9% (220°C). Estes resultados apontam para uma baixa suscetibilidade da auto-hidrólise para as glucanas, o que vai de encontro ao pretendido. Também no que se refere à recuperação de produtos solúveis resultantes da hidrólise da glucana os valores foram, como seria de esperar, muito baixos. A produção máxima de GlcOS foi de apenas 1,25 g/100 g de matéria-prima (para 210°C). Este valor reduzido de produção de gluco-oligosacáridos (GlcOS) foi semelhante ao obtido na auto-hidrólise de outras palhas como a palha de milho (Silva, 2013) e um pouco superior ao verificado para palha de trigo (Carvalho *et al.*, 2009). Contudo, foi cerca de metade do obtido na auto-hidrólise de carolo de milho (Moura *et al.*, 2007). Estas diferenças estarão provavelmente relacionadas com o tipo de glucana presente na matéria-prima mas, nalguns casos, também com o facto de os materiais apresentarem maior ou menor teor de açúcares, mais facilmente extratáveis, i.e., açúcares solúveis presentes na matéria-prima e que possam dar origem a oligómeros e monómeros de glucose. Interessa ainda referir que a palha de cana utilizada, quando recebida já havia sido sujeita a uma lavagem prévia.

Dada a fraca solubilização da glucana seria também de prever uma baixa formação de compostos de degradação como o HMF. Tal foi verificado, tendo este composto sido detetado apenas nas condições de maior severidade (220°C e 230°C), correspondendo o máximo apenas a 0,29 g/100 g.

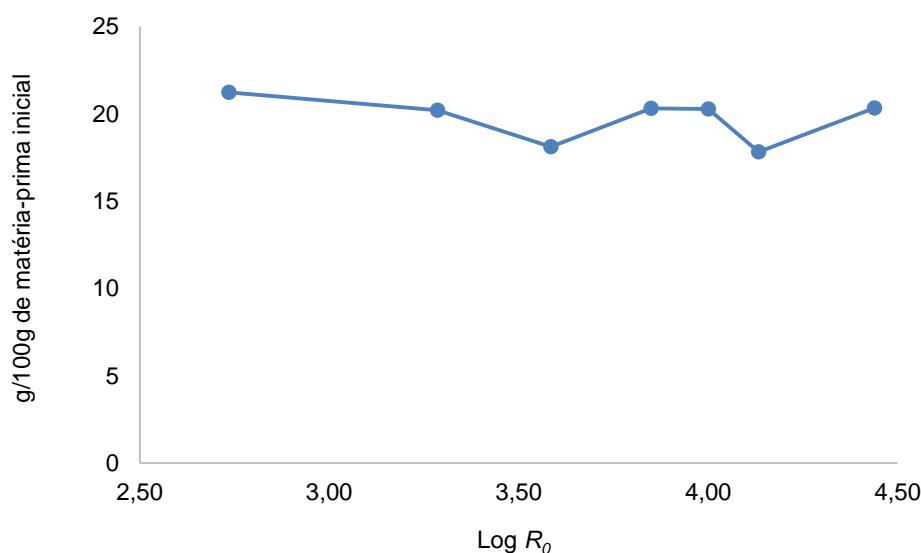


Figura 17 - Efeitos da auto-hidrólise no rendimento em lenhina *Klason* após auto-hidrólise

A Figura 17 ilustra o efeito do tratamento hidrotérmico utilizado na lenhina *Klason*. Como é possível observar, praticamente não foi verificada solubilização da lenhina *Klason* com os tratamentos de auto-hidrólise, mantendo-se o rendimento obtido maioritariamente constantes com o aumento da severidade.

Em geral, os tratamentos aplicados foram bastante seletivos para as hemiceluloses, sem grande efeito na hidrólise de glucanas ou na lenhina *Klason*, indo ao encontro dos objetivos do trabalho. Este facto aponta a auto-hidrólise como um passo viável e promissor para a valorização da palha de cana-de-açúcar.

3.2.2. Caracterização dos licores

Na Tabela 9 apresentam-se os valores de pH e a composição química dos licores resultantes da auto-hidrólise da palha de cana-de-açúcar, para as diferentes temperaturas. Tal como se pode observar, os XOS são, em geral, o composto presente em concentração mais elevada sendo o valor máximo obtido de 11,12 g/L.

Tabela 9 – Valores de pH e composição química dos licores obtidos após auto-hidrólise de palha de cana-de-açúcar.

Log R_0	2,74	3,29	3,59	3,85	4,00	4,13	4,44
	(170°C)	(190°C)	(200°C)	(210°C)	(215°C)	(220°C)	(230°C)
pH	5,21	4,88	4,67	4,04	3,82	3,74	3,45
Composição (g/l)							
XOS	1,52	2,72	7,25	11,12	9,57	7,10	1,96
GlcOS	0,74	0,80	0,81	1,10	0,89	0,97	0,64
Glucose	0,64	0,75	1,08	1,41	1,66	1,59	1,68
Xilose	0,20	0,29	0,50	1,31	2,49	4,23	2,99
Arabinose	0,42	0,73	1,23	1,43	1,47	1,37	0,87
Ácido acético	0,24	0,40	0,85	1,15	1,53	2,08	2,95
Ácido fórmico	0,07	0,24	0,52	0,82	1,13	1,63	2,44
Furfural	0	0	0,04	0,24	0,70	1,58	2,45
HMF	0	0	0	0	0,01	0,06	0,20

XOS, xilo-oligossacáridos; GlcOS, gluco-oligossacáridos, HMF, 5-hidroximetil furfural

A concentração total das pentoses monoméricas e oligoméricas nos licores aumentou, na maior parte dos casos, com a severidade dos tratamentos, até $\log R_0 = 4,00$. Dentro deste grupo de compostos, a xilose foi a principal, atingindo um máximo de 4,23 g/L ($\log R_0 = 3,74$). Com o aumento da severidade, a concentração deste açúcar decresceu, formando-se alguns produtos de degradação. De entre os tratamentos realizados, o tratamento a 210°C foi o que permitiu obter a concentração de XOS mais elevada, mantendo uma concentração de produtos de degradação em valores relativamente reduzidos. Nestas condições, foi obtida a maior razão de oligossacáridos/monossacáridos, sendo esta de 2,95. Na condição mais severa, este parâmetro foi apenas 0,47, indicando uma recuperação das pentoses fundamentalmente na sua forma monomérica.

Nas glucanas houve uma solubilização reduzida sob forma de gluco-oligossacáridos (GlcOS), não ultrapassando os 1,1 g/l no tratamento de recuperação máxima. Nas condições menos severas foram detetadas solubilizações de polissacáridos e monossacáridos bastante reduzidas. Com o aumento da severidade, dos tratamentos acima de 210°C, foi possível

verificar a degradação dos polissacáridos, da xilose e arabinose e a consequente subida da concentração de furfural e HMF, principalmente no tratamento a 230°C.

Para além de oligossacáridos e monossacáridos, nos licores obtidos foram também detetados outros produtos resultantes da hidrólise das hemiceluloses, tais como o ácido acético. Para este composto foi obtida uma concentração máxima de 2,95 g/L no tratamento mais severo. Para além do ácido acético, foi também detetada a presença de ácido fórmico em menor concentração, aumentando também com a severidade do tratamento. A libertação do ácido acético e a produção de ácido fórmico deverá afetar o pH final dos hidrolisados obtidos. Com se pode observar na Tabela 5, o pH diminui com o aumento da severidade do tratamento variando entre 5,21 e 3,45. Este facto deve-se provavelmente à presença destes ácidos alifáticos referidos.

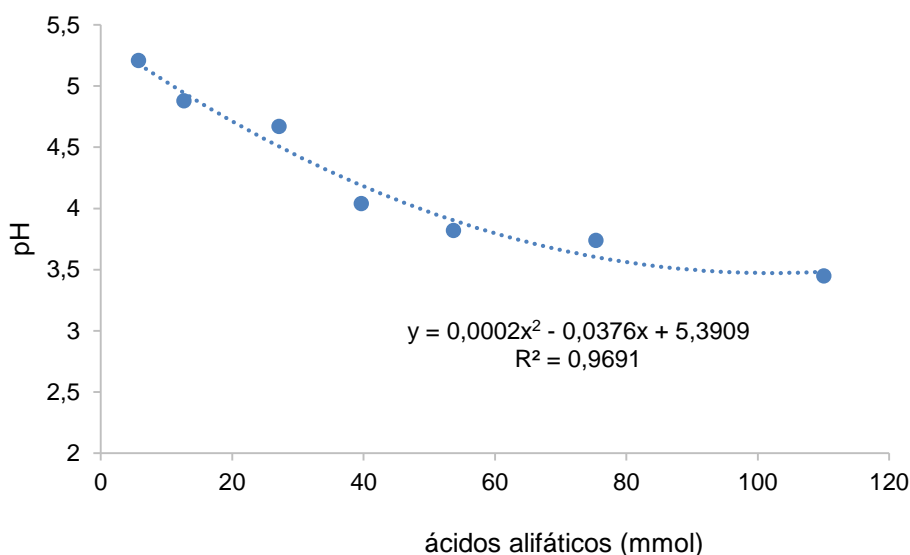


Figura 18 - Variação de pH nos licores resultantes da auto-hidrólise em função da concentração de ácidos alifáticos presentes.

A Figura 18 ilustra o perfil de variação de pH dos licores em função da concentração de ácidos alifáticos totais (fórmico e acético). A variação de pH com a concentração de ácidos aproxima-se do linear até uma concentração total de ácidos de 60 mM e, a partir desse valor, quase que se mantém estável, independentemente do aumento do pH. Esta tendência que ocorre para as concentrações mais elevadas pode dever-se ao facto de existir possivelmente alguma tamponização do meio.

É importante referir que o aumento da concentração destes ácidos, ao longo dos tratamentos, poderá ter uma influência importante nos resultados acima descritos. Durante o tratamento de auto-hidrólise, não só a ação ácida dos iões H_3O^+ provenientes da auto-

ionização da água (Garrote *et al.*, 2002), mas também devido à presença do ácido acético proveniente da hidrólise dos grupos acetilo do material, tomam um papel fundamental na despolimerização das hemiceluloses e subsequente formação de oligómeros e monómeros (Nabarlitz *et al.*, 2007).

3.2.3. Caracterização química do sólido

Os sólidos resultantes do processamento hidrotérmico foram caracterizados quimicamente de modo a avaliar uma posterior valorização potencial. Na Figura 19 é apresentada a composição química dos resíduos sólidos obtida para as diferentes temperaturas de auto-hidrólise, bem como o correspondente rendimento em sólido, um parâmetro útil para monitorizar a solubilização que ocorre com os tratamentos.

Verifica-se que para a temperaturas superiores a 200°C ($\log R_0 > 3,59$), ocorreu uma diminuição significativa do rendimento em sólido, passando de valores superiores a 80%, para valores da ordem dos 60%. Os tratamentos de auto-hidrólise afetaram maioritariamente os componentes hemicelulósicos. A percentagem de arabino(xilana) nos sólidos diminuiu com o aumento da severidade do tratamento. Estes componentes foram detetados apenas nos resíduos sólidos dos tratamentos até 215°C, indicando a sua total solubilização nos tratamentos entre 220°C e 230°C.

Ao contrário dos que acontece nas hemiceluloses, nas glucanas, o comportamento foi o oposto. Em todos os tratamentos pode constatar-se uma presença maioritária destes componentes, indicando que não houve a sua solubilização. Com o aumento da severidade dos tratamentos, a percentagem de glucanas no resíduo sólido aumentou, subindo de 39,6% no tratamento a 170°C para 66% no tratamento efetuado a 230°C. Em termos de degradação das glucanas, verifica-se que a degradação máxima ocorreu no tratamento efetuado a 220°C, sendo da ordem dos 9%.

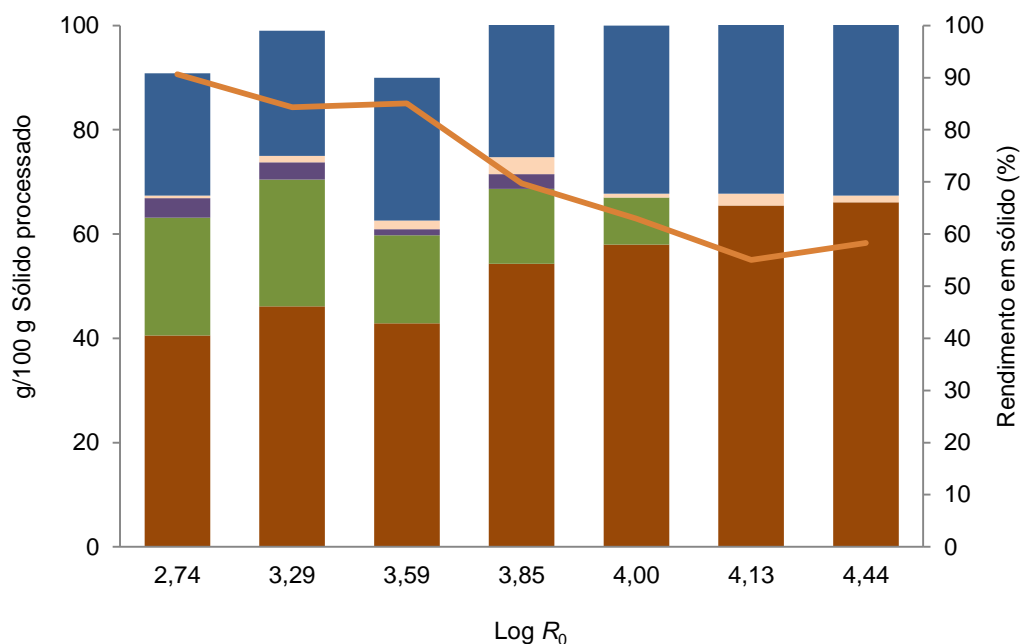


Figura 19 - Composição dos sólidos obtidos após auto-hidrólise, em função do fator de severidade. Nesta figura estão representados os teores obtidos de glucanas (■), Xilanas (■), arabinanas (■), grupos acetilo (■), lenhina Klason (■) e rendimento em sólido (—).

O teor lenhina Klason no resíduo sólido também aumentou com a severidade do tratamento. No tratamento menos severo, o teor foi de 18,6%, aumentando para valores de 34,9% no tratamento mais severo (230°C). Assim, demonstra-se que os tratamentos hidrotérmicos realizados não têm efeito significativo neste componente.

Com este trabalho, é possível constatar que este tipo de tratamento hidrotérmico não teve um efeito significativo na lenhina Klason e nas glucanas, favorecendo assim uma posterior valorização dos resíduos sólidos obtidos através de outros processos, tais como hidrólise enzimática, testada mais a frente neste estudo.

3.3. Análise FTIR

Foram efetuadas análises por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para caracterizar a matéria-prima e os sólidos pré-tratados a 210°C e 230°C (log R_0 3,85 e 4,44 respectivamente). Estas condições foram as escolhidas, de modo a melhor interpretar o impacto do tratamento hidrotérmico na condição que foi considerada ótima (para a recuperação de XOS) e na condição mais severa (correspondente à percentagem mais elevada de glucana na fase sólida).

Na Figura 20 estão representados os espectros obtidos para as três amostras num intervalo de 800-1800 cm^{-1} . De acordo com a bibliografia, para a celulose estão reportados os comprimentos de onda de 892, 1035, 1049, 1061, 1107, 1161 e 1376 cm^{-1} . Para a lenhina foi tomada especial atenção aos comprimentos de onda de 1420, 1458, 1508, 1654, 1702 e 1718 cm^{-1} , sendo estes, característicos desta fração. Para a fração hemicelulósica estão descritos como comprimentos de onda característicos os valores de 997, 1046, 1251, 1637 e 1734 cm^{-1} . Adicionalmente, os comprimentos de onda de 876, 1112 e 1161 são característicos de ambas as frações: celulósica e hemicelulósica (Costa Lopes *et al.*, 2013; Costa Lopes *et al.*, 2013).

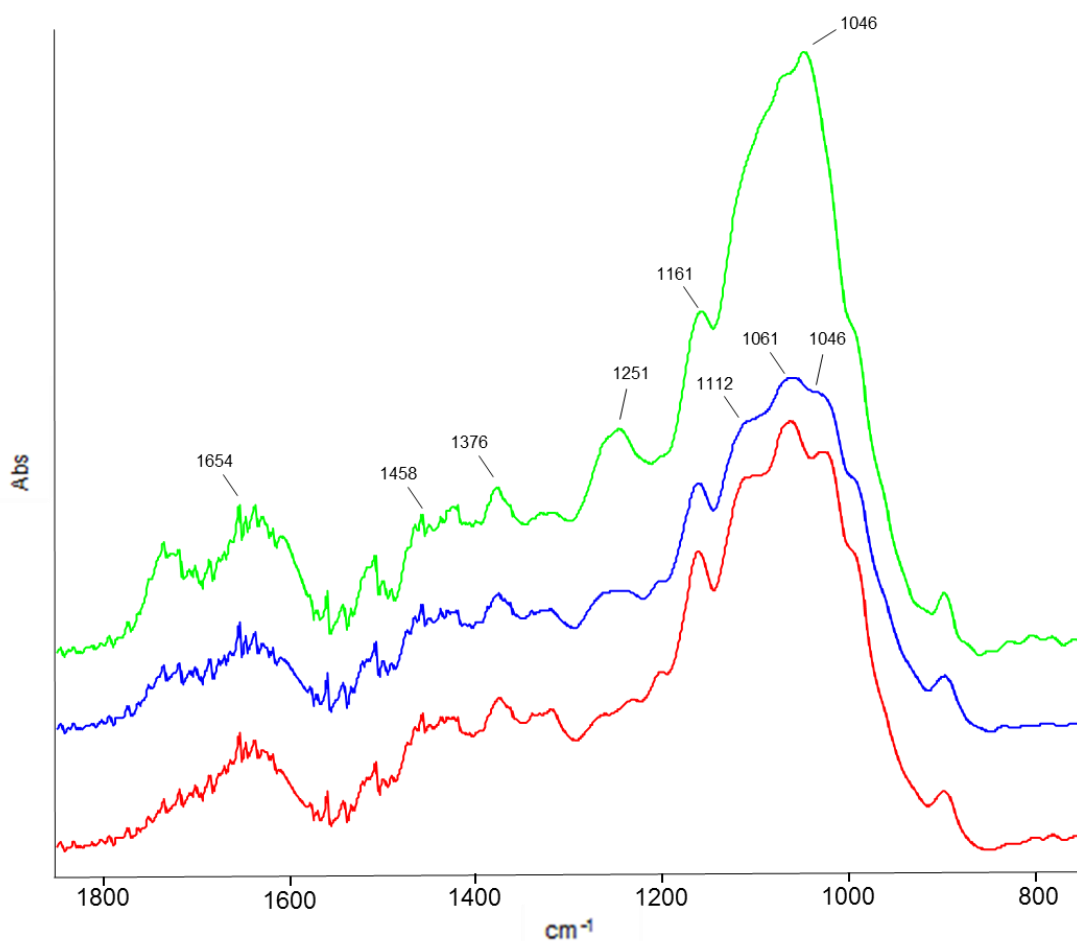


Figura 20 - Espectros de FTIR obtidos para amostra de matéria-prima (—) e sólidos pré-tratados a 210 (—) e 230 C (—).

Na amostra não tratada e entre 950 e 1150 cm^{-1} é possível observar apenas um dos picos característicos, referidos anteriormente, que se dissipa na amostra pré-tratada a 210°C e onde aparecem vários picos definidos na amostra do tratamento mais severo. Este fenómeno pode ser justificado com a remoção das hemiceluloses durante o pré-tratamento.

Observa-se também que para os comprimentos de onda característicos das hemiceluloses podem verificar-se alterações significativas nos espectros. A 1046 cm^{-1} pode observar-se um pico bem definido na amostra inicial que desaparece em ambos os tratamentos. Também a 1112 e 1161 cm^{-1} é possível observar um aumento da definição dos picos nas amostras tratadas, face à amostra inicial, podendo inferir-se um desaparecimento ou grande diminuição das contribuições da fração hemicelulósica nestas bandas. Por fim, o pico observado na amostra inicial a 1251 cm^{-1} desaparece completamente na amostra tratada a 230°C .

Como verificado anteriormente, na caracterização química dos sólidos (3.2.3), os sólidos pré-tratados a 210°C ainda contêm hemiceluloses, o que não acontece com os sólidos obtidos a 230°C . Deste modo, é compreensível o aumento da definição dos picos das hemiceluloses, referido no espectro dos sólidos a 210°C , para os espectros dos sólidos obtidos a 230°C . Em alguns dos casos, pode mesmo verificar-se um desaparecimento quase total da contribuição hemicelulósica para essas bandas, como no caso de 1251 e 1046 cm^{-1} .

Verifica-se também uma diminuição do pico a 1740 cm^{-1} nas amostras hidrolisadas o que é indicativo da diminuição de grupos acetilo das hemiceluloses, em concordância com o aumento de ácido acético nos licores.

Observando os picos da celulose, como 1161 e 1376 cm^{-1} , não se verificaram alterações muito significativas após os tratamentos, observando-se apenas um aumento da definição nos picos causado pela diminuição da interferência da fração hemicelulósica. O mesmo acontece a 1061 cm^{-1} onde, a 230°C , este pico característico da celulose aparece bem evidenciado, o que não acontecia na amostra inicial, e que estará relacionado com o enriquecimento da amostra em celulose, após auto-hidrólise.

Relativamente à lenhina, não se verificaram alterações relevantes nos espectros consoante como aumento da severidade dos tratamentos. Nos picos mais característicos (1420 , 1458 , 1508 , 1654 , 1702 e 1718 cm^{-1}) não foram verificadas alterações significativas, indicando que os tratamentos apenas conduziram à obtenção de um sólido rico em lenhina (o que já tinha sido verificado anteriormente na caracterização química do sólido (ponto 3.2.3)).

3.4. Hidrólise enzimática

Os tratamentos hidrotérmicos discutidos anteriormente levaram a uma hidrólise significativa das hemiceluloses do material, permitindo obter resíduos sólidos ricos em celulose e lenhina. Uma possibilidade de aproveitamento da celulose consiste na sua sacarificação enzimática, de modo a obter hidrolisados ricos em glucose que podem ser utilizados em diversos processos, sendo o mais comum a produção de etanol.

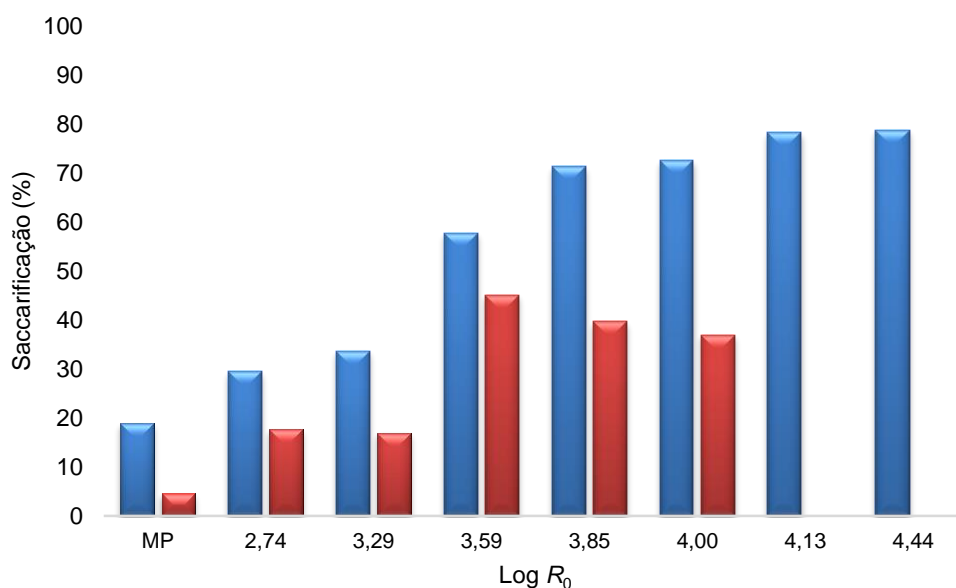


Figura 21 - Percentagens de sacarificação obtidas após hidrólise enzimática da matéria-prima (MP) e resíduos sólidos dos tratamentos. Glucose (■) e xilose (■).

Deste modo efetuou-se um teste de hidrólise enzimática para determinar um possível aproveitamento das glucanas. Para este estudo foram utilizados os resíduos sólidos resultantes dos tratamentos e uma amostra do material inicial não submetido a auto-hidrólise. Como é possível constatar, através da Figura 21, para a amostra inicial foram obtidos valores reduzidos de solubilização de glucanas, resultando num baixo teor de glucose recuperado após a hidrólise enzimática (20%). Também o valor de xilose recuperada foi reduzido (4,5%).

No caso da glucose, a sua recuperação aumentou com a severidade do tratamento, tendo atingido os seus valores máximos nos sólidos tratados a 220 e 230°C. O valor máximo de sacarificação foi próximo dos 80% no sólido pré-tratado a 230°C, valor este bastante superior ao obtido na hidrólise enzimática da matéria-prima inicial. Comparativamente a outras biomassas pré-tratadas por auto-hidrólise, os resultados obtidos foram semelhantes

aos obtidos por outros autores, como por exemplo, para palha e bagaço de cana-de-açúcar moídos (Silva *et al.*, 2010). Comparando com outros materiais, os resultados foram semelhantes aos obtidos após tratamento hidrotérmico para o eucalipto (Silva-Fernandes *et al.*, 2013) e superiores aos obtidos para a palha de sorgo (Corredor *et al.*, 2007). Contudo, os valores obtidos foram inferiores à sacarificação de 100% obtida para a palha de trigo (Rossberg *et al.*, 2014).

É interessante efetuar também uma comparação bibliográfica com os resultados obtidos utilizando outros pré-tratamentos. Com explosão com vapor, foram obtidos resultados semelhantes aos deste trabalho, utilizando resíduos de oliveira deslenhificados (Cara *et al.*, 2007), e inferiores utilizando resíduos de girassol (Ruiz *et al.*, 2008). Com hidrólise com ácidos diluídos foram obtidos resultados de sacarificação de 80% em amostras de dreche cervejeira e fibras de milho (Noureddini *et al.*, 2009), valor este, semelhante ao verificado neste trabalho.

Assim, a auto-hidrólise parece ser um pré-tratamento de onde são obtidos sólidos pré-tratados que têm resultados bastante favoráveis, quando submetidos a uma hidrólise enzimática. Mesmo quando comparados com outros pré-tratamentos, os resultados de sacarificação são semelhantes ou ligeiramente superiores. Sendo os custos associados à auto-hidrólise mais reduzidos a par com outras vantagens já referidas, este processo hidrolítico aparenta poder ser um método preferencial, quando comparado com uma hidrólise com ácidos diluídos ou com explosão com vapor.

Em todos os sólidos pré-tratados, que ainda continham hemicelulose, verificou-se uma recuperação de xilose que variou entre 17-45%.

O conjunto de resultados obtidos permitiu comprovar que o tratamento de auto-hidrólise utilizado aumenta a digestibilidade enzimática da palha de cana-de-açúcar, podendo ser esta uma boa via de valorização deste material.

3.5. Perspetiva de aplicação

Para compreender melhor a aplicação deste estudo, foram calculados os balanços de recuperação e de aproveitamento das frações mais facilmente valorizáveis, por tonelada de palha de cana-de-açúcar. Estes cálculos foram efetuados para a condição ótima de produção de XOS (210°C) e para o tratamento com maior percentagem de sacarificação obtida, isto é, 230°C. De modo a ter uma visão mais enquadrada do aproveitamento da fração celulósica

foi efetuado um cálculo teórico de produção de etanol, assumindo um rendimento de fermentação teórico de 51% e a densidade do etanol de 0,79 (Figura 23).

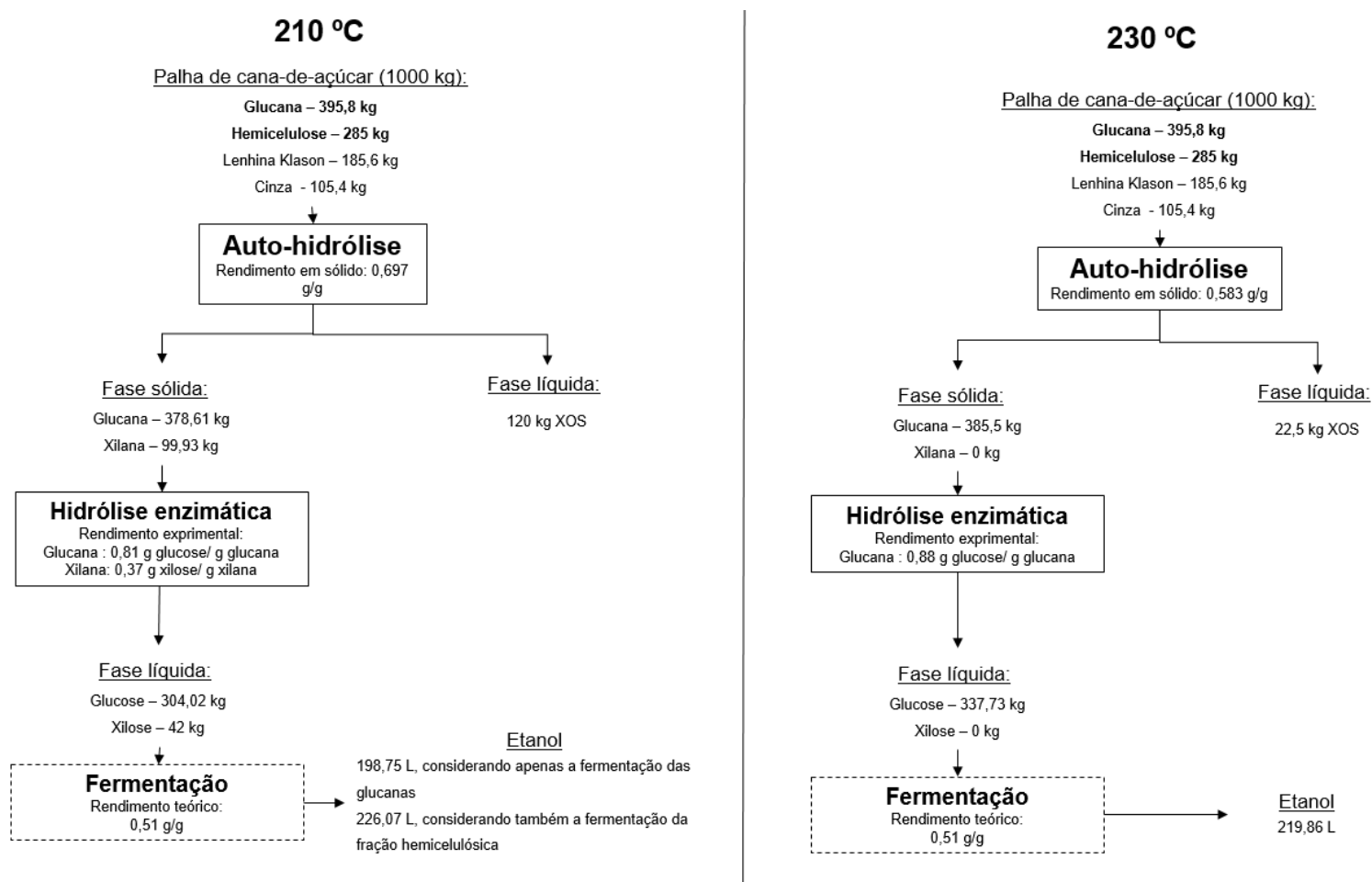


Figura 22- Balanço de aproveitamento da palha de cana-de-açúcar utilizando auto-hidrólise a 210°C e 230°C testada neste estudo.

A grande diferença entre tratamentos, com impacto na possibilidade de valorização, prende-se com a recuperação das hemiceluloses. Como visto anteriormente (pontos 3.2.1 e 3.2.2), na condição mais severa, observou-se uma recuperação de hemiceluloses no licor obtido por auto-hidrólise reduzida, traduzindo-se em menos de 10% dos XOS que potencialmente se poderiam obter a partir da matéria-prima. Para além disso, no sólido obtido, não se observou a presença de hemiceluloses. Deste modo, como resultado deste tratamento, podem ser obtidos, por tonelada de palha, 25 kg de XOS e uma fração celulósica que teoricamente poderá produzir 278,9 litros de etanol.

Em contraste, utilizando a condição ótima de recuperação de oligossacáridos, é possível obter, por tonelada de palha, 120 kg de XOS.

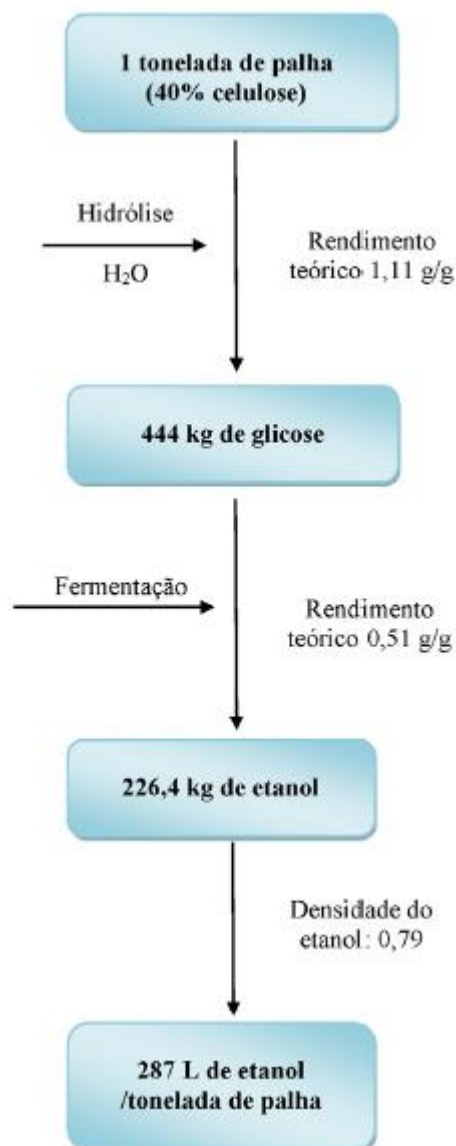


Figura 23 - Rendimento teórico da produção de etanol por tonelada de palha de cana-de-açúcar (adaptado de : (Santos *et al.*, 2012).

Comparando com os valores do rendimento em etanol teórico passível de ser obtido a partir da palha ((Santos et al., 2012), Figura 23), e que correspondem a 287 L/ton de palha, a quantidade final de etanol que se deveria obter seria um pouco inferior ao esperado. Isto prende-se, em primeiro lugar, com o facto de ter sido obtida uma recuperação total da celulose do material no resíduo sólido (92,2% da celulose inicial) inferior aos 100% teóricos. Também o rendimento de hidrólise enzimática (0,81 g/g para 210°C e 0,88 g/g para 230°C) foi inferior aos 1,1 g/g ideais. É de salientar que, para os cálculos experimentais (Figura 22), foi utilizado o rendimento de fermentação teórico de 0,51 g/g, devido à ausência de dados experimentais determinados neste estudo para este parâmetro. Assim, este estudo aponta

para uma produção teórica de etanol, a partir da fração celulósica, de 198,8 L (para 210°C) e 219,9 L (para 230°C), no lugar dos 287 L ideais. Assim, este estudo aponta para um rendimento de produção de etanol de 70% (para 210°C) ou 77% (para 230°C).

Utilizando o valor de compra de etanol de Abril de 2015 (0,39 €/L) ([Http://www.cepea.esalq.usp.br](http://www.cepea.esalq.usp.br), 2015) é possível especular sobre a receita gerada através desta valorização. Em termos de valorização de xilo-oligossacáridos, os valores dependem do tipo de produto e da sua natureza e pureza (podendo o preço variar entre 9 e 50 €/kg) (<http://portuguese.alibaba.com>, 2015). Contudo, considerando os valores mais baixos encontrados para o preço deste produto, é possível conjecturar sobre a receita gerada através do aproveitamento das diversas frações da palha de cana-de-açúcar (Tabela 10).

Tabela 10 – Aproveitamento monetário teórico para a produção de etanol e xilo-oligossacáridos a partir de palha de cana-de-açúcar após tratamento hidrotérmico a 210°C e 230°C.

Frações utilizadas		210°C	230°C
Produção de etanol	Glucana	77,51€	85,75€
	Glucana + Xilana	88,17€	
	Glucana + Xilana + pentoses*	104,49€	103,45€
Valorização independente de XOS	XOS	1080,00€	202,50€

*Pentoses monoméricas e oligoméricas.

Comparando os diferentes cenários possíveis de valorização, pode dizer-se que no caso da condição ótima de produção de oligossacáridos (210°C) é possível obter uma receita, em teoria e sem considerar os custos de investimento, produção e matéria-prima de 1157,5€ (dos quais 1080€ em xilo-oligossacáridos), por tonelada de palha de cana-de-açúcar. Utilizando apenas a fração celulósica para a produção de etanol é possível obter, de um ponto de vista teórico, 77,5€. Ainda nesta condição, no caso de uma valorização de toda a palha apenas focada na produção de etanol é possível, teoricamente, obter 104,5€ de receita. Contudo, neste caso a fermentação de ambas as frações, celulósica e hemicelulósica, pode trazer custos operacionais acrescidos e dificuldades a nível da utilização de diferentes

microrganismos para cada fração, que podem não justificar a receita suplementar obtida, quando comparada com a produção de etanol a partir apenas da fração celulósica.

Para a condição de 230°C, e considerando apenas a fração sólida para a produção de etanol, é possível obter uma receita monetária teórica mais elevada do que para 210°C (85,85 €). Neste caso, a valorização direta dos oligossacáridos conduz também a receitas muito mais baixas (202,5 €), uma vez que nesta condição existe uma degradação bastante apreciável dos açúcares. Assim, o conjunto dos resultados obtidos permite concluir que o tratamento a 210°C é o mais rentável a nível da valorização dos polissacáridos da palha de cana-de-açúcar.

4. Conclusões e perspectivas futuras.

O estudo efetuado mostrou que o processo hidrotérmico utilizado (auto-hidrólise) conduziu a uma hidrólise seletiva das hemiceluloses da palha de cana-de-açúcar, resultando numa possível recuperação das mesmas sob a forma de xilo-oligossacáridos (XOS).

A temperatura de 210°C foi considerada a condição ótima para a auto-hidrólise de palha de cana-de-açúcar, tendo-se obtido uma recuperação máxima de hemiceluloses, com formação de produtos de degradação inibidores em quantidades bastante reduzidas.

O tratamento de auto-hidrólise utilizado não teve grandes efeitos nas frações de celulose e lenhina do material, permitindo obter sólidos constituídos maioritariamente por celulose e lenhina, favorecendo uma valorização posterior.

A sacarificação enzimática dos sólidos pré-tratados resultou num rendimento elevado, mostrando ser uma alternativa viável para valorização posterior dos mesmos.

Em suma, os resultados obtidos mostraram que as metodologias utilizadas são adequadas a uma valorização integral da palha de cana-de-açúcar, permitindo obter xilo-oligossacáridos, licores ricos em pentoses, e soluções ricas em glucose, viáveis para uma futura produção de etanol.

Os resultados obtidos mostram também que, do ponto de vista económico, parece ser mais vantajoso a valorização separada da corrente líquida contendo oligossacáridos e da fração sólida, que poderá ser utilizada para a produção de etanol.

Em termos de perspectivas futuras seria interessante a realização de novos ensaios de auto-hidrólise a outras temperaturas, nomeadamente testar os efeitos de auto-hidrólise em condições isotérmicas, de forma a poder identificar condições de temperatura mais baixas que facilitem a operação a nível industrial.

Seria também interessante avaliar a estabilidade dos XOS obtidos, assim como as suas propriedades bioativas, nomeadamente pré-bióticas. Propõe-se ainda um estudo do efeito da deslenhificação, com recuperação da lenhina, nas percentagens de sacarificação enzimática.

Bibliografia

- Adney, B., & Baker, J. (2008). "Measurement of cellulase activities". Innovation for our energy future. In *National Renewable Energy Laboratory (NREL)*. Golden, Colorado, USA.
- Agriculture, I.-A. I. for C. on. (2007). *Agroenergy and biofuels Atlas of the Americas I. Ethanol* (pp. 45–65).
- Alves, M. (2011). *Estudo de sistemas de cogeração em usinas de açúcar e álcool, com utilização do bagaço e palha da cana*. (Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.). Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas.
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., & Negro, M. J. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, 101(13), 4851–4861.
- AOAC. (2000). "Official methods of analysis: Agricultural chemicals, contaminants and drugs." In *Forest products chemistry*. Washington D.C., USA, Association of Official Analytical Chemists.
- Araújo, A. L. S. (2013). *Efeito da Palha da Cana-de-açúcar (Saccharum Officinarum) na Germinação e Emergência do Sorgo Sacarino (Sorghum bicolor L. Moench)* (Trabalho de Graduação apresentado à Faculdade de Tecnologia de Araçatuba, do Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, como requisito parcial para conclusão do curso de Tecnologia em Biocombustíveis sob a orientação do Prof. Dr. Ronaldo da Silv). Faculdade de Tecnologia de Araçatuba.
- Baudel, H. M. (2006). *Pré-tratamento e hidrólise In: III workshop Tecnológico: Hidrólise para produção de ethanol*. São Paulo, Brasil.
- BC Rural. (2013). Retrieved from <http://bcrural.com.br/noticias/mecanizacao-da-colheita-da-cana-ja-chega-a-90-em-araraquara/>
- Beldman, G., Hennekam, J., & Voragen, A. G. J. (1987). Enzymatic hydrolysis of beer brewers' spent grain and the influence of pretreatments. *Biotechnology and Bioengineering*, 30, 668–671.
- Belkacemi, K., Abatzoglou, N., Overend, R. P., & Chornet, E. (1991). Phenomenological kinetics of complex systems - mechanistic considerations in the solubilization of hemicelluloses following aqueous steam treatments. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 30, 2416–2425.
- Berghem, L. E. R., & Pettersson, L. G. (1974). Mechanism of enzymatic cellulose degradation: Isolation and some properties of a beta-glucosidase from *Trichoderma viride*. *European Journal of Biochemistry*, 46, 295–305.
- Biermann, J. (1996). *Handbook of pulping and papermaking*,. (Academic Press, Ed.) (2nd ed.).

- Biopol. (2008). *Description of the general biorefinery concept*. Research Institute Biopol, Germany.
- BNDES, & CGEE. (2008). *Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável*. (BNDES, Ed.) (1st ed., pp. 1–316). Rio De Janeiro.
- Boussarsar, H., Rogé, B., & Mathlouthi, M. (2009). Optimization of sugarcane bagasse conversion by hydrothermal treatment for the recovery of xylose. *Biosource Biothechnology*, 100, 6537–6542.
- Bozell, J. J., Black, S. K., Myers, M., Cahill, D., Miller, W. P., & Park, S. (2011). Solvent fractionation of renewable woody feedstocks: Organosolv generation of biorefinery process streams for the production of biobased chemicals. *Biomass & Bioenergy*, 35, 4197–4208.
- Bozell, J. J., Holladay, J. E., Johnson, D., & White, J. F. (2007). *Top value added chemicals from biomass. Volume II - Results of screening for potential candidates from biorefinery lignin*.
- Brás, T., Guerra, V., Torrado, I., Lourenço, P., Carneiro, F., Duarte, L. C., & Neves, L. A. (2014). Detoxification of hemicellulosic hydrolysates from extracted olive pomace by diananofiltration. *Process Biochemistry*, 49, 173–180.
- Bridgeman, T. G., Darvell, L. I., Jones, J. M., Williams, P. T., Fahmi, R., Bridgwater, A. V, ... Donnison, I. S. (2007). Influence of particle size on the analytical and chemical properties of two energy crops. *Fuel*, 86, 60–72.
- Buranov, A. U., & Mazza, G. (2008). Lignin in straw of herbaceous crops. *Industrial Crops and Products*, 28, 237–259.
- Cara, C., Moya, M., Ballesteros, I., Negro, M. J., González, A., & Ruiz, E. (2007). Influence of solid loading on enzymatic hydrolysis of steam exploded or liquid hot water pretreated olive tree biomass. *Process Biochemistry*, 42, 1003–1009.
- Carrasco, F., Chornet, E., Overend, R. P., & Heitz, M. (1986). Fraccionnement de deux bois tropicaux (Eucalyptus and Wapa) par traitement thermomécanique en phase aqueuse. Partie I: conversion et profils de solubilisation. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 64, 986–993.
- Carrasco, J., Sáiz, M., Navarro, A., Soriano, P., Sáez, F., & Martínez, J. (1994). Effects of dilute acid and steam pretreatments on the cellulose structure and kinetics of cellulosic fraction hydrolysis by dilute acids in lignocellulosic materials. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 44/45, 23–34.
- Carvalho, F. (2004). Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewery's spent grain. *Bioresource Technology*, 91, 93–100.
- Carvalho, F., Duarte, L. C., Bogel-lukasik, R., & Moniz, P. (2013). *Biorrefinarias* (pp. 7–10).
- Carvalho, F., Duarte, L. C., & Gírio, F. M. (2008). Hemicellulose biorefineries : a review on biomass pretreatments. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 67, 849–864.

- Carvalho, F., Silva-Fernandes, T., Duarte, L. C., & Gírio, F. M. (2009). Wheat straw autohydrolysis: process optimization and products characterization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 153(1-3), 84–93.
- Cheng, K. K., Zhang, J. A., Chavez, E., & Li, J. P. (2010). Integrated production of xylitol and ethanol using corncob. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 411–417.
- Chum, H. L., Johnson, D. K., Black, S., Baker, J., Grohmann, K., Sarkanen, K. V., ... Schroeder, H. A. (1988). Organosolv pretreatment for enzymatic hydrolysis of poplars. I. Enzyme hydrolysis of cellulosic residues. *Biotechnology and Bioengineering*, 31, 643–649.
- Colombia Sugar Annual 2013. (n.d.). Retrieved January 06, 2015, from <http://www.thecropsite.com/reports/?id=1960>
- Corredor, D. Y., Bean, S., & Wang, D. (2007). Pretreatment and enzymatic hydrolysis of sorghum bran 1. *Cereal Chemistry*, 84, 61–66.
- Cortés-betancourt, E. (2002). *Advising Growers on Conditions for Sugarcane Burning in Cauca Valley (Colombia) Using Data Obtained From an Automated Weather Network* (pp. 221–232).
- Crayonstock.com. (2014). Retrieved from http://a1.images.crayonstock.com/image/private/s-NvLyL-e---/cs_srgb,h_300,q_80,w_448/l_CrayonStock-Watermark-QuickView-4_bu4eit,w_224,h_150,c_fit/13946503969613.jpg
- Da Costa Lopes, A. M., João, K. G., Bogel-Lukasik, E., Roseiro, L. B., & Bogel-Lukasik, R. (2013). Pretreatment and Fractionation of Wheat Straw Using Various Ionic Liquids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 7874–7882.
- Da Costa Lopes, A. M., João, K. G., Rubik, D. F., Bogel-Lukasik, E., Duarte, L. C., Andraus, J., & Bogel-Lukasik, R. (2013). Pre-treatment of lignocellulosic biomass using ionic liquids: wheat straw fractionation. *Bioresource Technology*, 142, 198–208. doi:10.1016/j.biortech.2013.05.032
- Da Silva, A., Inoue, H., Endo, T., Yano, S., & Bon, E. S. (2010). Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Bioresource Technology*, 101, 7402–7409.
- Dekker, R. F. H., & Wallis, A. F. A. (1983). Autohydrolysis-explosion as pretreatment for the enzymic saccharification of sunflower seed hulls. *Biotechnology Letters*, 5, 311–316.
- Dermibas, A. (2009). *Biofuels*. (Springer, Ed.) (1st ed., pp. 45–85).
- Duarte, L., Carvalho, F., Lopes, S., Marques, S., Parajó, J., & Fm., G. (2004). Comparison of two posthydrolysis processes of brewery's spent grain autohydrolysis liquor to produce a pentose - containing culture medium. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 113-116, 1041–1048.
- Dunlop, A. P. (1948). Furfural formation and behavior. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 40, 204–209.

- El Hage, R., Chrusciel, L., Desharnais, L., & Brosse, N. (2010). Effect of autohydrolysis of *Miscanthus x giganteus* on lignin structure and organosolv delignification. *Bioresource Technology*, 101, 9321–9329.
- Escária, S. (2008). *Análise do impacto potencial das exigências da sustentabilidade na difusão dos biocombustíveis*. Sphera Departamento de prospectiva e planeamento e relações internacionais.
- FAOSTAT. (2013). <http://faostat.fao.org/>
- Fengel, D. and Wegener, G. (1983). *Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions* (pp. 1–613). Berlin, Germany, Walter de Gruyter & Co.
- Garrote, G., Dom, H., & Parajó, J. C. (2002). Autohydrolysis of corncob : study of non-isothermal operation for xylooligosaccharide production. *Journal of Food Engineering*, 52, 211–218.
- Garrote, G., H. Domínguez, & Parajo, J. C. (1999). Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. *Holz Als Roh- Und Werkstoff*, 57, 191–202.
- Geddes, C. C., Mullinnix, M. T., Nieves, I. U., Peterson, J. J., Hoffman, R. W., York, S. W., Ingram, L. O. (2011). Simplified process for ethanol production from sugarcane bagasse using hydrolysate-resistant *Escherichia coli* strain MM160. *Bioresource Technology*, 102, 2702–2711.
- Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, 59, 257–268.
- Girio, F. M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L. C., Marques, S., & Bogel-Lukasik, R. (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*, 101(13), 4775–800.
- Goldstein, I. S. (1982). Acid processes for cellulose hydrolysis and their mechanisms. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 184, 55–76.
- Gonçalves, A. R., Ruzene, D. S., Moriya, R. Y., & Oliveria, L. R. M. (2005). Pulping of sugarcane bagasse and straw and bioleaching of the pulps: Conditions parameters and recycling of enzymes. In *Presented at the 59th Appita Conference, Auckland, New Zealand, 1619 May 2005* (pp. 1–10).
- González, D., Santos, V., & Parajó, J. C. (2011). Manufacture of fibrous reinforcements for biocomposites and hemicellulosic oligomers from bamboo. *Chemical Engineering Journal*, 167, 278–287.
- Grethlein, H.E. e Converse, A. O. (1991). Common aspects of acid prehydrolysis and steam explosion for pretreating wood. *Bioresource Technology*, 36, 77–82.
- Grohmann, K., Torget, R. e Himmel, M. (1985). Optimization of dilute acid pretreatment of biomass. *Biotechnology Bioengineering Symposium*, 15, 59–80.
- Gronewold, N. (2011). Colombia Pursues Sweet Dream of Becoming a Sugar-Cane Ethanol Powerhouse. *New York Times*.

- Harmsen, P., Huijgen, W., Bermudez, L., & Bakker, R. (2011). *Literature Review of Physical and Chemical Pretreatment Processes for Lignocellulosic Biomass*.
- Hassuani, S., Regis, M., & Carvalho, I. (2005). *Biomass power generation: sugar cane bagasse and trash*. (P. PNUD-CTC, Ed.) *Piracicaba: PNUD-CTC* (1st ed., p. 217).
- Heitz, M., Capek-Ménard, E., Koeberle, P. G., Gagné, J., Chornet, E., Overend, R. P., ... Yu, E. (1991). Fractionation of *Populus tremuloides* at the pilot-plant scale: optimization of steam pretreatment conditions using the STAKE II technology. *Bioresource Technology*, 35, 23–32.
- Herrera, A., Téllez-Luis, S., González-Cabriales, J., Ramírez, J., & Vázquez, M. (2004). Effect of the hydrochloric acid concentration on the hydrolysis of sorghum straw at atmospheric pressure. *Journal of Food Engineering*, 63, 103–109.
- Hörmeyer, H. F., Schwald, W., G. Bonn, & Bobleter, O. (1988). Hydrothermolysis of Birch Wood as Pretreatment for Enzymatic Saccharification. *Physics and Technology of Wood*, 42, 95–98.
- Hsu, T. A., Ladisch, M. R., & Tsao, G. T. (1980). Alcohol from cellulose. *Chemical Technology*, 10, 315–319.
- <http://portuguese.alibaba.com>. (2015).
<http://portuguese.alibaba.com/goods/xylooligosaccharides.html>
- <Http://www.cepea.esalq.usp.br>. (2015). <http://www.cepea.esalq.usp.br/etanol/?page=407>
- Huang, D.-L., Zeng, G.-M., Feng, C.-L., Hu, S., Lai, C., Zhao, M.-H., Liu, H.-L. (2010). Changes of microbial population structure related to lignin degradation during lignocellulosic waste composting. *Bioresource Technology*, 101, 4062–7.
- Hugot, E. (1986). *Handbook of cane sugar engineering* (3rd ed.). Nova Iorque: Elsevier Science Publishing Company.
- Huijgen, W. J. J., Smit, A. T., Wild, P. J., & den Uil, H. (2012). Fractionation of wheat straw by prehydrolysis, organosolv delignification and enzymatic hydrolysis for production of sugars and lignin. *Bioresource Technology*, 114, 389–398.
- Imman, S., Arnthong, J., Burapatana, V., Laosiripojana, N., & Champreda, V. (2013). Autohydrolysis of Tropical Agricultural Residues by Compressed Liquid Hot Water Pretreatment. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 170, 1982–1995.
- Joaquim, A. P. (1997). *Estudo das etapas de ativação no processo de benzilação da polpa de medula de bagaço de cana-de-açúcar*. (S. Carlos, Ed.) (1st ed., pp. 1–78).
- Kamm, B. (2007). Production of platform chemicals and synthesis gas from biomass. *Angewandte Chemie International Edition*, 46, 5056–5058.
- Kamm, B., Gruber, P. R., & Kamm, M. (2006). *Biorefineries – Industrial Processes and Products*. Germany, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. (pp. 1–497).

- Kim, M., & Day, D. F. (2011). Composition of sugar cane, energy cane, and sweet sorghum suitable for ethanol production at Louisiana sugar mills. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38, 803–807.
- Kim, S. B., Yum, D. M., & Park, S. C. (2000). Step-change variation of acid concentration in a percolation reactor for hydrolysis of hardwood hemicellulose. *Bioresource Technology*, 72, 289–294.
- Kirk, T., & Farrell, R. (1987). Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology*, 41, 465–505.
- Kubikova, J., Zemann, A., Krkoska, P., & Bobleter, O., J. (1996). Hydrothermal pretreatment of wheat straw for the production of pulp and paper. *Tappi Journal*, 79, 163–169.
- Landell, M. G. de A. (2010). *Germoplasma da cana-de-açúcar. Programa Cana IAC*.
- Laser, M., Schulman, D., Allen, S. G., Lichwa, J., Antal, M. J., & Lynd, L. R. (2002). comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. *Bioresource Technology*, 81, 33–44.
- Lee, J. (1997). Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of Biotechnology*, 56, 1–24.
- Limayem, A., & Ricke, S. C. (2012). Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science*, 38, 449–467.
- Lora, J., H.Glasser, & G., W. (2002). Recent industrial applications of lignin: a sustainable alternative to nonrenewable materials. *Journal of Polymers and Environment*, 10, 39–48.
- Lynd, L. R., Wyman, C. E., & Gerngross, T. U. (1999). Biocommodity engineering. *Biotechnology Progress*, 15, 777–793.
- Mancilha, I. M., & Karim, M. N. (2003). Evaluation of ion exchange resins for removal of inhibitory compounds from corn stover hydrolyzate for xylitol fermentation. *Biotechnology Progress*, 19, 1837–1841.
- Martínez, J., Granado, J., Montané, D., Salvadó, J., & Farriol, X. (1995). Fractionation of residual lignocellulosics by dilute-acid prehydrolysis and alkaline extraction: application to almond shells. *Bioresouce Technology*, 52, 59–67.
- Matsuoka, S., Garcia, A. A. F., & Arizono, H. (2005). Melhoramento da cana-de-açúcar. In: BORÉM, A. Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa: UFV, (2 ed.), p. 225–274.
- Mesa, L., Gonzalez, E., Cara, C., Gonzalez, M., Castro, E., & Mussatto, S. I. (2011). The effect of organosolv pretreatment variables on enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. *Chemical Engineering Journal*, 168, 1157–1162.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426–428.

- Miranda, I., & Pereira, H. (2002). The variation of chemical composition and pulping yield with age and growth factors in young *Eucalyptus globulus*. *Wood and Fiber Science*, 34, 140–145.
- Moniz, P. M. A. (2014). *Processos de fracionamento de resíduos agroindustriais para obtenção de hemiceluloses e lenhina de elevada qualidade para aproveitamento integrado no âmbito de uma biorrefinaria* (Tese de Doutoramento em engenharia alimentar). ISA - UL Lisboa.
- Moniz, P., Pereira, H., Duarte, L. C., & Carvalheiro, F. (2014). Hydrothermal production and gel filtration purification of xylo-oligosaccharides from rice straw. *Industrial Crops and Products*, 62, 460–465.
- Moniz, P., Pereira, H., Quilhó, T., & Carvalheiro, F. (2013). Characterization and hydrothermal processing optimization of corn straw towards the selective fractionation of hemicelluloses. *Industrial Crops and Products*, 50, 145–153.
- Moraes, M. A. F. D. de. (2007). O mercado de trabalho da agroindústria canavieira: desafios e oportunidades. *Economia Aplicada*, 11, 605–619.
- Moreno, L. M. (2011). *Transição da colheita da cana-de-açúcar manual para a mecanizada no estado de São Paulo: cenários e perspectivas* (Dissertação de Pós-Graduação em Energia da Universidade de São Paulo). Universidade de São Paulo.
- Mosier, N. et al. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 96, 673–686.
- Moura, P., Barata, R., Carvalheiro, F., Gírio, F., Loureiro-Dias, M. C., & Esteves, M. P. (2007). In vitro fermentation of xylo-oligosaccharides from corn cobs autohydrolysis by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. *LWT - Food Science and Technology*, 40, 963–972.
- Moure, A., Gullon, P., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2006). Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. *Process Biochemistry*, 41, 1913–1923.
- Nabarlantz, D., Ebringerová, A., & Montané, D. (2007). Autohydrolysis of agricultural by-products for the production of xylo-oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 69, 20–28.
- Niga, E. (2010). Bioethanol from Lignocellulosic Biomass : A review (pp. 1–9).
- Noureddini, H., Byun, J., & Yu, T.-J. (2009). Stagewise dilute-acid pretreatment and enzyme hydrolysis of distillers' grains and corn fiber. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 159, 553–567.
- Oliveira, E. E., Silva, A. E., Nagashima, T., Gomes, M. C. S., Aguiar, L. M., Marcelino, H. R., Egito, E. S. T. (2010). Xylan from corn cobs, a promising polymer for drug delivery: Production and characterization. *Bioresouce Technology*, 101, 5402–5406.
- Olsson, L., & Hahn-Hägerdal, B. (1996). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology*, 18, 312–331.

- Onda, A., Ochi, T., & Yanagisawa, K. (2009). Hydrolysis of cellulose selectively into glucose over sulfonated activated-carbon catalyst under hydrothermal conditions. *Topics in Catalysis*, 52, 801–807.
- Overend, R. P., & Chornet, E. (1989). Steam and aqueous pretreatments: are they prehydrolysis? In Wood processing and utilization. Chichester: Ellis Horwood Limited, 395–400.
- Overend, R. P., E., C., & Gascoigne, J. A. (1987). Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series A-Mathematical Physical and Engineering Sciences*, 321, 523–536.
- Palmqvist, E., & Hahn-Hägerdal, B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: Inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*, 74, 17–24.
- Palmqvist, E., & Hahn-Hägerdal, B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, 74(1), 25–33.
- Parisi, F. (1989). Advances in lignocellulosics hydrolysis and the utilization of the hydrolysates. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 38, 53–87.
- Pereira, H., Graça, J., & Rodrigues, J. C. (2003). *Wood chemistry in relation to quality: Wood quality and its biological basis*. In: Jeronimidis, J. R. B. a. G. (ed.) Barnett J.R. & Jeronimidis G. (Oxford: Blackwell Publishing., Ed.).
- Pinto, P. C. R., Silva, E. A. B., & Rodrigues, A. E. (2010). Comparative study of solid-phase extraction and liquid-liquid extraction for the reliable quantification of high value added compounds from oxidation processes of wood-derived lignin. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 49, 12311–12318.
- Prentice, N., & D'Appolonia, B. L. (1977). High-fiber bread containing brewers spent grain. *Cereal Chemistry*, 54, 1084–1095.
- Ragauskas, A. J., Williams, C. K., Davison, B. H., Britovsek, G., Cairney, J., A., E. C., ... Tschaplinski, T. (2003). The Path Forward for Biofuels and Biomaterials. *Science*, 311, 484–489.
- Ripoli, T. C. C., & Ripoli, M. L. C. (2008). *Palhiço como fonte de energia*. In: Dinardo-Miranda, L. L.; Vasconcelos, A. C. M.; Landell, M. G. A. *Cana-de-açúcar*. Campinas: IAC, (pp. 791–806).
- Rivas, S., Gullón, B., Gullón, P., Alonso, J. L., & Parajó, J. C. (2012). Manufacture and properties of bifidogenic saccharides derived from wood mannan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 4296–4305.
- Ropars, M., Marchal, R., Pourquié, J., & Vandecasteele, J. (1992). Largescale enzymatic hydrolysis of agricultural lignocellulosic biomass. Part 1: Pretreatment procedures. *Bioresource Technology*, 42, 197–204.
- Rossberg, C., Steffien, D., Bremer, M., Koenig, S., Carneiro, F., Duarte, L. C., ... Fischer, S. (2014). Pulp properties resulting from different pretreatments of wheat straw and their influence on enzymatic hydrolysis rate. *Bioresource Technology*, 169, 206–212.

- Ruiz, E., Cara, C., Manzanares, P., Ballesteros, M., & Castro, E. (2008). Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. *Enzyme and Microbial Technology*, 42, 160–166.
- Santos, F. A., Queiróz, J. H. de, Colodette, J. L., Fernandes, S. A., Guimarães, V. M., & Rezende, S. T. (2012). Potencial da palha de cana-de-açúcar para a produção de etanol. *Química Nova*, 35, 1004–1010.
- Saska, M., & Ozer, E. (1995). Aqueous extraction of sugarcane bagasse hemicellulose and production of xylose syrup. *Biotechnology and Bioengineering*, 45, 517–523.
- Scheller, H. V., & Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 263–89.
- Seabra, J. E. A. (2008). *Análise de opções tecnológicas para o uso integral da biomassa no setor de cana de açúcar e suas implicações*. (Dissertação (Doutorado em Engenharia Mecânica) - Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas). Campinas.
- Selig, M., Weiss, N., & Ji, Y. (2008). Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass Laboratory Analytical Procedure (LAP). In *National Renewable Energy Laboratory*.
- SIADDEB. (2013). Sociedade Ibero-Americana para o desenvolvimento das biorrefinarias. Retrieved September 23, 2014, from <http://www.siaddeb.org/>
- Sidrach, W. (2010). The environmentally benign pulping process of non-wood fibers. *Journal of the Science and Technology*, 17, 123.
- Silva, N. A. da. (2013). *Processos de fracionamento para a valorização da palha de milho* (Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química com ramo nos Recursos Renováveis e Biorrefinarias). Universidade de Aveiro.
- Silva-Fernandes, T., Carvalheiro, F., Duarte, L. C., Marques, S., Fonseca, C., & Gírio, F. M. (2013). Upgrading eucalyptus residues for sugar-based biorefineries: integration of hydrothermal pre-treatment and enzymatic hydrolysis. In *XXII Tecnicalpa - Conferência Internacional da Floresta, pasta e Papel*. Tomar:
- Sindhu, R., Binod, P., Janu, K. U., Sukumaran, R. K., & Pandey, A. (2012). Organosolvent pretreatment and enzymatic hydrolysis of rice straw for the production of bioethanol. *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 28, 473–483.
- Sjöström, E. (1981). *Wood chemistry: Fundamentals and application*. (Academic Press Inc., Ed.) (1st ed., p. cap. 1, 3 e 4).
- Sluiter, A. D., Hames, B. R., Ruiz, R., Scarlata, C. J., Sluiter, J. B., Templeton, D., & W. (2008). Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples. Laboratory Analytical Procedure (LAP). In *National Renewable Energy Laboratory*.
- Sluiter, A. D., Ruiz, R. O., Scarlata, C. J., Sluiter, J. B., & Templeton, D. W. (2008). Determination of Extractives in Biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP). In *National Renewable Energy Laboratory*.

- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., & Templeton, D. (2005). "Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples". In *Innovation for our energy future National Renewable Energy Laboratory*. Golden, Colorado.
- Stewart, D. (2008). Lignin as a base material for materials applications: Chemistry, application and economics. *Industrial Crops and Products*, 27, 202–207.
- Stryer, L. (1998). *Biochemistry*. (N. Y. H. Freeman, Ed.) (4th edition., pp. 1–1064).
- Sun, Y., & Cheng, J. Y. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83, 1–11.
- Superbia, F. F., & Paula, N. F. D. E. (2011). Utilização da palha de cana de açúcar para produção de papel artesanal. *Ciência & Tecnologia: FATEC-JB, Jaboticabal*, 3, 1–4.
- Taherzadeh, M. J., Eklund, R., Gustafsson, L., Niklasson, C., & Lidén, G. (1997). Characterization and fermentation of dilute-acid hydrolyzates from wood. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 36, 4659–4665.
- Taherzadeh, M. J., & Karimi, K. (2004). Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *BioResources*, 2, 472–499.
- Taherzadeh, M. J., & Karimi, K. (2007). Enzymatic-based hydrolysis processes for Ethanol. *BioResources*, 2, 707–738.
- Toledano, A., Serrano, L., & Labidi, J. (2012). Organosolv lignin depolymerization with different base catalysts. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 87, 1593–1599.
- Torget, R., Walter, P., Himmel, M., & Grohmann, K. (1991). Dilute-acid pretreatment of corn residues and short-rotation woody crops. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 28–29, 75–86.
- Torrado, I. M. R. (2010). *Optimização da hidrólise com ácido diluído para o fracionamento selectivo das hemiceluloses de palha de sorgo: estudo da bioconversão dos hidrolisados para produção de xilitol* (Dissertação de Mestrado). Universidade do Algarve.
- Tzvelev, N. N. (1989). The system of grasses (Poaceae) and their evolution. *The Botanical Review*, 55, 141–204.
- Ulbricht, R. J., Northup, S. J., & Thomas, J. A. (1984). review of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions. *Fundamental and Applied Toxicology*, 843–853.
- USI. (2009). USI Biorefinarias. Retrieved September 23, 2014, from www.usibiorefinarias.com.br
- Vidal, B., Dien, B., Ting, K., & Singh, V. (2011). Influence of feedstock particle size on lignocellulose conversion: A Review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164, 1405–1421.

- Voll, C. E. (2005). *Aplicação de vinhaça e do extrato de palhiço de cana-de-açúcar no controle de plantas daninhas* (Dissertação (Mestrado em Agronomia. Área de Concentração: Fitotecnia)). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, São Paulo.
- Weng, J.-K., Li, X., Bonawitz, N. D., & Chapple, C. (2008). Emerging strategies of lignin engineering and degradation for cellulosic biofuel production. *Current Opinion in Biotechnology*, 19, 166–172.
- Wolf, L. D. (2011). *Pré-tratamento Organossolve do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol e obtenção de xilooligômeros* (Aplicação de vinhaça e do extrato de palhiço de cana-de-açúcar no controle de plantas daninhas). Universidade de São Paulo.
- Wright, J. D. (1988a). Ethanol from biomass by enzymatic hydrolysis. *Chemical Engineering Progress*, (84), 1–14.
- Wright, J. D. (1988b). Ethanol from biomass by enzymatic hydrolysis. *Chemical Engineering Progress*, (84), 62–74.
- Wyman, C. E., Dale, B. E., Elander, R. T., Holtzapple, M., Ladisch, M. R., & Lee, Y. Y. (2005). Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource Technology*, 96, 1959–66.
- Yu, G., Yano, S., Inoue, H., Inoue, S., Endo, T., & Sawayama, S. (2010). Pretreatment of rice straw by a hot-compressed water process for enzymatic hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160, 539–551.
- Zhong, C., Lau, M. W., Balan, V., Dale, B. E., & Yuan, Y. J. (2009). Optimization of enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation from AFEX-treated rice straw. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84, 667–676.

Anexos

Anexo I. Métodos analíticos

A humidade (H) das amostras foi calculada segundo a seguinte equação:

$$\%H = \frac{\text{Peso da amostra húmida (g)} - \text{Peso amostra seca (g)}}{\text{Peso da amostra húmida (g)}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

O teor de cinza (C) das amostras foi calculado usando a seguinte expressão:

$$\%Cinza = \frac{\text{Peso da cinza (g)}}{\text{Peso da amostra seca (g)}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

A percentagem de extratáveis foi determinada pela equação seguinte:

$$\text{Extratáveis (\%)} = \frac{m - m_0}{A * (1 - H)} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde,

m corresponde à a massa do balão mais extratáveis, após cada uma das extrações (g);

m_0 é a massa do balão (vazio) determinada inicialmente (g);

A corresponde à massa da amostra (g) pesada para dentro do cartucho.

H corresponde à humidade da amostra

Cálculo da proteína total

A proteína total foi determinada a partir do teor em azoto total, determinado de acordo com o método de *Kjedahl* (1975). As amostras a analisar foram pesadas diretamente nos tubos de digestão. Foi tomada uma massa de 0,5 g de amostra à qual se adicionou 10 g de mistura catalisadora e 20 mL de H_2SO_4 concentrado (96% p.p⁻¹), e colocaram-se os tubos com as amostras preparadas na unidade de aquecimento do aparelho de digestão (Digestion System 6 Modelo 1007, Tecator, Suécia).

Seguidamente colocaram-se as cápsulas do sistema de extração de fumos e abriu-se a fonte de vácuo. Nos primeiros 30 min do processo, a temperatura foi moderada e após este período foi elevada até 420 °C, durante 1,5 h. Uma vez terminada a digestão, e após arrefecimento do conteúdo dos tubos, adicionou-se 100 mL de água destilada e 50 mL de ácido bórico 4% (p/v). Em seguida colocaram-se os tubos na unidade de destilação (Kjeltec System modelo 1026, Tecator, Suécia).

Durante esta operação de destilação foi libertado amoníaco, por adição da solução de NaOH, que é arrastado por uma corrente de vapor de água sendo depois recolhido na solução de ácido bórico. Em seguida, o amoníaco foi doseado por titulação com HCl 0,1 N, em presença da solução indicadora de pH (indicador de Tashiro) que se torna violeta a pH 4,8.

Para o ensaio em branco procedeu-se da mesma forma, substituindo a massa da amostra por água destilada.

A percentagem de azoto total foi calculada através de:

$$Azoto\ total\ (\%) = 0,14 \cdot \left(\frac{V-V_0}{A}\right) \quad \text{Equação 4}$$

Onde,

V - corresponde ao volume de solução de HCl 0,1 N gasto na titulação (mL);

V₀ - corresponde o volume da solução de HCl 0,1 N gasto na titulação do ensaio em branco (mL);

A - corresponde à massa de amostra (g) (em massa seca)

O fator de conversão utilizado para o cálculo da proteína foi N×6,25.

Tabela 11 - Reagentes utilizados na determinação da proteína total.

Mistura catalisadora	Sulfato de cobre	3 g
	Óxido de titânio	3 g
	Ácido esteárico	1 g
	Sulfato de potássio	93 g
Solução de ácido bórico	4% (p/v)	
Solução de ácido clorídrico	0,1 N	
Solução de hidróxido de sódio	50% (p/v)	
Indicador	Indicador de Tashiro*	

*Dissolveram-se 2 g de vermelho de metilo e 1 g de azul de metileno em 100 mL de álcool etílico 95% (v/v). A solução foi conservada em frasco escuro.

Anexo II. Determinação das atividades enzimáticas

Método do DNS

A quantificação das atividades enzimáticas de FPAse e de Endoglucanase foi feita tendo por base a quantificação das concentrações de glucose (mg/mL) determinadas através do método do DNS, o ácido 3,5-dinitrosalicílico (Miller, 1959).

Este método baseia-se na redução, em meio alcalino, do DNS a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico (uma substância corada que absorve fortemente a 540 nm), pelos glícidos redutores, sendo os grupos carbonilo do glícido oxidados a carboxilo. A presença em solução do sal de *Rochelle* justifica-se como proteção do reagente ao oxigénio dissolvido.

Preparação do reagente DNS:

Foram adicionados 50 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 2N a 2,5 g de DNS e aproximadamente 125 mL de água destilada e foram agitados até à dissolução. Posteriormente, foram adicionadas 75g do sal de *Rochelle* (Tartarato duplo de sódio e potássio) e o volume foi feito até 250 mL com água destilada. Faz-se notar que esta solução é diferente da proposta no protocolo do NREL (Adney & Baker, 2008), no entanto tem sido utilizada com sucesso no laboratório do LNEG.

Obtenção da curva padrão:

De acordo com o quadro 16, foram preparadas 5 diluições a partir de uma solução padrão de glucose 10 mM, às quais se adicionam 0,5 mL de solução de DNS.

Tabela 12 - Preparação da curva de calibração do método do DNS

Tubos	Glucose (10mM) (mL)	V água (mL)	DNS (mL)
1	0,0	0,75	0,5
2	0,1	0,65	
3	0,2	0,55	
4	0,3	0,45	
5	0,4	0,35	

Seguidamente, os tubos foram agitados e colocados num banho de água em ebulição durante 5 min. Terminada a reação, foi feito um arrefecimento dos tubos, à temperatura ambiente e, per fez-se o volume para 5mL, com água destilada. Seguidamente foi feita a leitura das absorvâncias no espectrofotómetro JASCO a 540 nm.

Cálculo das atividades enzimáticas

Após construída a reta de calibração, as diluições usadas para cada enzima, são traduzidas em termos de concentração de enzimas de acordo com a expressão seguinte:

$$[enzimas] = \frac{1}{D} = \frac{V_{enz(dil)}}{V_{total(dil)}} \quad \text{Equação 5}$$

Onde D é a diluição, Venz(dil) é o volume da enzima na diluição e Vtotal(dil) é o volume total de diluição.

Para calcular a atividade enzimática de FPase (FPU/mL), após tradução das diluições em termos de concentração de enzimas, são estimadas as concentrações de enzima necessárias para libertar exatamente 0,5 mg de glucose, traçando uma curva da glucose libertada em função da concentração das enzimas. Finalmente a atividade da FPase é calculada através da expressão:

$$FPase (FPU/mL) = \frac{0,37}{[Enzima]_{0,5Glc}} \quad \text{Equação 6}$$

Onde, [Enzima]_{0,5Glc} é a concentração de enzima necessária para libertar 0,5 mg de glucose (Ghose, 1987).

Para determinar a atividade enzimática de celobiase (IU/mL), são estimadas as concentrações de enzima necessárias para libertar exatamente 1,0 mg de glucose, traçando

uma curva da glucose libertada em função da concentração das enzimas. Finalmente a atividade da Celobiase é calculada segundo a expressão:

$$\text{Celobiase (IU/mL)} = \frac{0,0926}{[\text{Enzima}]_{1\text{Glc}}} \quad \text{Equação 7}$$

Onde, $[\text{Enzima}]_{1\text{Glc}}$ é a concentração de enzima necessária para libertar 1,0 mg de glucose (Ghose, 1987).

Para determinar a atividade enzimática de endoglucanase (IU/mL), são estimadas as concentrações de enzima necessárias para libertar exatamente 0,5 mg de glucose, traçando uma curva da glucose libertada em função da concentração das enzimas. Finalmente a atividade da Celobiase é calculada segundo a expressão:

$$\text{Endoglucanase (IU/mL)} = \frac{0,185}{[\text{Enzima}]_{0,5\text{Glc}}} \quad \text{Equação 8}$$

Onde, $[\text{Enzima}]_{0,5\text{Glc}}$ é a concentração de enzima necessária para libertar 0,5 mg de glucose (Ghose, 1987).